
MASTERARBEIT

Herr
Alexander Eisold, B.Sc.

**Potenzial eines neuartigen
Aptamer-basierten Filtersystems
für endokrine Disruptoren:
Molekulardynamische Simulation
des Anti-E2-Aptamers und die
automatisierte Überführung in
ssPNA**

MASTERARBEIT

Potenzial eines neuartigen Aptamer-basierten Filtersystems für endokrine Disruptoren: Molekulardynamische Simulation des Anti-E2-Aptamers und die automatisierte Überführung in ssPNA

Autor:

Alexander Eisold, B.Sc.

Studiengang:

Molekularbiologie/Bioinformatik (M.Sc.)

Seminargruppe:

MO12w1-M

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde

Zweitprüfer:

Michael Spranger, M.Sc.

Mittweida, August 2014

Bibliografische Angaben

Alexander, Eisold, B.Sc.: Potenzial eines neuartigen Aptamer-basierten Filtersystems für endokrine Disruptoren: Molekulardynamische Simulation des Anti-E2-Aptamers und die automatisierte Überführung in ssPNA, 95 Seiten, 27 Abbildungen, 13 Tabellen, 1 CD, Hochschule Mittweida, University of Applied Sciences, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik

Masterarbeit, 2014

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Satz: L^AT_EX

Referat

Hormonelle Belastungen in Grund-, Oberflächen und Trinkwasser sind weitreichend bekannt. Die daraus resultierenden Einflüsse auf das endokrine System bei Mensch und Tier, besonders durch das endogene Steroidhormon 17β -Estradiol (E2), sind bewiesen und führen unter anderem zu Feminisierung, Dezimierung von Spermien und kann als Indikator bei Brustkrebs wirken. Bisherige Filteranlagen können die rückstandslose Entfernung von pharmakologisch wirksamen Stoffen und deren Rückstände aus den Oberflächen-, Grund- und Trinkwässern nicht gewährleisten. Ein neuartiger Reinigungsansatz auf Aptamer-basis sollte untersucht werden und dessen Potential E2 aus belasteten Gewässern zu entfernen. Das bereits existierende und E2 selektive DNA Aptamer wurde *in silico* durch molekular dynamischen Simulationen untersucht um möglich Bindungsstellen zu identifizieren. Das ssDNA Aptamer wurde in die robustere PNA überführt. Diese soll anstelle der DNA in das Filtersystem integriert werden und *in vivo* Einsatz getestet werden.

Hormonal encumbrances in ground, surface and drinking water are widely known. The resulting effects on the endocrine system in humans and animals, especially by the endogenous steroid hormone 17β -estradiol (E2), are proven and among other things cause feminization, depletion of sperm and can act as an indicator in breast cancer. The industry of sewage treatment plants (STPs) cannot provide the removal of pharmaceutical compounds in surface, ground and drinking water. A novel cleaning approach on aptamer basis should be examined and the potential of remove E2 from polluted waters. The already existing and E2 selective DNA aptamer was studied *in silico* by molecular dynamic simulations to identify possible binding motifs. The ssDNA aptamer was transferred to the more robust PNA. These will be integrated into the filter system instead of the DNA and *in vivo* usage to be tested.

I. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	v
Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	ix
Abkürzungsverzeichnis	x
Vorwort	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Motivation	1
1.2 Problemstellung	2
1.3 Zielstellungen	3
2 Grundlagen und Vorbetrachtung	4
2.1 Trinkwasserversorgung	4
2.2 Häufige Pharmaka	5
2.2.1 Analgetika	5
2.2.2 Antibiotika	6
2.2.3 Antiepileptika	7
2.2.4 Kardiovaskuläre Medikamente	7
2.2.5 Estrogene und hormonelle Verbindungen	7
2.3 Eintragspfade von Arzneimitteln	8
2.3.1 Punktquellen	8
2.3.2 Verzweigtequellen	9
2.4 Eintragspfade von Estrogenen	10
2.4.1 Estrogene in Abwasserreinigungsanlagen	10
2.4.2 Estrogene in Oberflächengewässern	11
2.4.3 Estrogene im Grundwasser	11
2.4.4 Estrogene im Trinkwasser	12
2.5 Biologische Grundlagen	12
2.5.1 Hormone	12
2.5.2 17 β -estradiol	16
Gesundheitliche Auswirkungen	18
2.5.3 Reinigungsverfahren	19
Tropfkörperanlagen	20
Belebschlammverfahren	20
Membran-Bioreaktoren (MBR)	20
Ozonisierung	21
Aktivkohle (AK)	21
Weiter Verfahren zur möglichen Abreinigung	21
2.5.4 Aptamer	22
Anti-E2-Aptamer	23

2.5.5	Peptid-Nukleinsäure	24
3	Methoden	26
3.1	Bindungscharakter von 17 β -Estradiol (E2)	26
3.2	Sekundärstrukturelemente des Anti-E2-Aptamers	26
3.2.1	Sekundärstrukturelemente der Substrukturen des Anti-E2-Aptamers	27
3.3	Molekulardynamische Simulation des Anti-E2-Aptamers	28
3.3.1	Molekulardynamische Simulation des AE2A-S1	31
3.4	Überführung in ssPNA	31
4	Ergebnisse	34
4.1	Bindungscharakter von 17 β -Estradiol	34
4.2	Sekundärstrukturelemente des Anti-E2-Aptamers	35
4.2.1	Sekundärstrukturelemente der Substrukturen des Anti-E2-Aptamers	36
4.3	Molekulardynamische Simulation des Anti-E2-Aptamers	37
4.3.1	Molekulardynamische Simulation des AE2A-S1	38
4.4	Überführung in ssPNA	41
5	Diskussion	42
5.1	Bindungscharakter von 17 β -Estradiol	42
5.2	Sekundärstrukturelemente des Anti-E2-Aptamers	42
5.2.1	Sekundärstrukturelemente der Substrukturen des Anti-E2-Aptamers	43
5.3	Molekulardynamische Simulation des Anti-E2-Aptamers	43
5.3.1	Molekulardynamische Simulation des AE2A-S1	44
5.4	Überführung in ssPNA	45
6	Schlussfolgerung	47
7	Ausblick	48
A	Anhang Methoden	50
A.1	Bindungscharakter von 17 β -Estradiol (E2)	51
A.2	PoseView Diagramm der 28 E2 bindenden Proteinstrukturen	53
A.3	Molekulardynamik Python Skript	58
B	Anhang Ergebnisse	60
B.1	Sekundärstrukturelemente des Anti-E2-Aptamers	60
C	Vorträge und Posterpräsentationen	63
C.1	Saxon Biotechnology Symposium 2014	63
C.2	15. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz	65
C.3	Review Ergebnis	72
C.4	Himmelfahrtstagung	75
D	CD	77
	Literaturverzeichnis	78
	Glossar	91

II. Abbildungsverzeichnis

2.1 Globale Trinkwasserversorgung nach Quellart des bereitgestellten Trinkwassers im Jahresvergleich 1990 und 2012.	5
2.2 Jahresüberblick des Trinkwasser Pro-Kopf-Verbrauchs in Deutschland gegenüber häufig verbrauchter Medikamente.	6
2.3 Schematische Übersicht der Zugangspfade von medizinischen Produkten ins Trinkwasser.	9
2.4 Quellen und deren Pfade von Steroidhormonen Einträgen in die Umwelt.	10
2.5 Biosynthese des Steroidhormons 17β -Estradiol.	15
2.6 Schematischer Aufbau der kovalenten Verankerung des Anti-E2-Aptamer am Glas NCS-Bead.	24
3.1 Bildung der gemeinsamen Substruktur der vorhergesagten Anti-E2-Aptamer Sekundärstrukturen A , B und C	28
3.2 Schematischer Modellierungsablauf von der Sequenzebene bis zur gelösten und neutralen 3D Struktur.	31
3.3 Schematische Darstellung der chemischen Struktur DNA und PNA als monomere Einheit als Skelettformel.	32
4.1 Quantitativer Überblick über die Wechselwirkungen von 28 bekannten Proteinen mit E2.	34
4.2 Sekundärstrukturvorhersagen des Anti-E2-Aptamers durch Mfold.	35
4.3 Struktur Dotplot der vorhergesagten Anti-E2-Aptamer Sekundärstrukturen A , B und C	36
4.4 Sekundärstrukturvorhersagen Substrukturen AE2A-S1 und AE2A-S2 durch Mfold.	37
4.5 Systemtemperatur im zeitlichen Verlauf der MD Simulation der AE2A-S1.	39
4.6 Absolute Anzahl der auftretenden Wasserstoffbrückenbindung bei einer Distanz von 3.5 Å, repräsentiert durch die Atome der Basenpaare AT und GC.	40
4.7 Absolute Anzahl der auftretenden Wasserstoffbrückenbindung bei einer Distanz von 2.5 Å, repräsentiert durch die Atome der Basenpaare AT und GC.	40
4.8 Ausschnitt des Anti-E2-Aptamers mit einem Ausschnitt der erzeugten ssPNA gegenübergestellt.	41

5.1 Vergleich der Vorhergesagten Sekundärstruktur A mit der Sekundärstruktur aus der KIM ET AL. Publikation.	43
5.2 Ausschnitt des Simulierten AE2A-S1 zum Zeitpunkt 2,49 ns.	45
7.1 Schematische Flussdiagramm der Evaluation und Modellierung des Anti-E2-Aptamers und deren komplexe Ausbildung mit E2.	48
7.2 Konzeptüberblick über eine mögliche Filterpatrone.	49
A.1 PoseView Diagramme der Proteinstrukturen PDBID: 1E6W, 1FDU, 1A52, 1IOL, 2OCF, 4J24.	53
A.2 PoseView Diagramme der Proteinstrukturen PDBID: 1ERE, 1PCG, 2YJA, 3OLL, 3OLS, 3UUD.	54
A.3 PoseView Diagramme der Proteinstrukturen PDBID: 1QKT, 1A27, 1FDS, 1FDT, 1LHU, 1FDW.	55
A.4 PoseView Diagramme der Proteinstrukturen PDBID: 1AQU, 1G50, 1GWR, 2J7X. . . .	56
A.5 PoseView Diagramme der Proteinstrukturen PDBID: 1JGL, 1JNN, 1QKU, 4J26. . . .	57
A.6 PoseView Diagramme der Proteinstrukturen PDBID: 2D06, 4JVL.	57

III. Tabellenverzeichnis

2.1 Geschätzte menschliche Estrogen Ausscheidung (pro Person)	11
2.2 Estrogen Konzentration in Abwasserreinigungsanlagen (Deutschland)	11
2.3 Estrogen Konzentration im Oberflächengewässern (Deutschland)	11
2.4 Estrogen Konzentration im Grundwasser (Deutschland)	12
2.5 Estrogen Konzentration im Trinkwasser (Deutschland)	12
2.6 Physikochemische Eigenschaften des endogenen Steroidhormon E2	16
2.7 Durchschnittliche E2 Referenzbereiche von Frauen, Männern und Kindern.	17
4.1 Thermodynamik der Mfold Faltungsvorhersage der Anti-E2-Aptamer Subsequenz (AE2A-S1).	38
4.2 Thermodynamik der Mfold Faltungsvorhersage der Anti-E2-Aptamer Subsequenz (AE2A-S2).	38
A.1 Auflistung alle 28 existierenden Proteinstrukturen aus der PDB die E2 als Liganden binden.	51
B.1 Thermodynamik der Mfold Faltungsvorhersage des Anti-E2-Aptamer (A).	60
B.2 Thermodynamik der Mfold Faltungsvorhersage des Anti-E2-Aptamer (B).	61
B.3 Thermodynamik der Mfold Faltungsvorhersage des Anti-E2-Aptamer (C).	62

IV. Abkürzungsverzeichnis

ΔG	minimale freie Faltungsenergie
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
K_S	Säuredissoziationskonstante
K_d	Verteilungskoeffizient zwischen Boden/Sediment und Wasser
K_{OC}	Verteilungskoeffizient zwischen organischem Kohlenstoff im Boden/Sediment und Wasser
K_{OW}	n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
A	Adenin
AE2A-S1	Anti-E2-Aptamers Subsequenz 1
AE2A-S2	Anti-E2-Aptamers Subsequenz 2
AK	Aktivkohle
AMP	Adenosinmonophosphat
ARA	Abwasserreinigungsanlagen
atm	Atmosphäre
bp	Basenpaare (base pairs)
C	Cytosin
CPU	Hauptprozessor (central processing unit)
CPV	Gemeinsames Vokabular für öffentliche Aufträge (Common Procurement Vocabulary)
DNA	Desoxyribonucleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dsDNA	Doppelstrang DNA (double-stranded DNA)
E1	Estrone
E2	17 β -Estradiol
E3	Estriol
EE2	17 α -Ethinylestradiol
EU	Europäische Union
FAB fragment	Fragment antigen-binding
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FN3	fibronectin type III domain
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
G	Guanin
GHz	Gigahertz

GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
H ₂ O	Wasser
K	Kelvin
kcal	Kilokalorien
kDa	Kilodalton
LBD	Ligandenbindungsdomäne (ligand binding domain)
LG	Laminin G domain-like
LH	Luteinisierendes Hormone
MB	Megabyte
MBR	Membran-Bioreaktoren
MD	Molekulardynamik
mol	Stoffmenge
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NCOA5	Nuclear receptor coactivator 5
nm	Nanometer
NR	Nuclear receptor
ns	Nanosekunden
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs
O ₂	Sauerstoff
O ₃	Ozon
PAP	Adenosine 3',5'-diphosphate
PDB	Protein-Datenbank (Protein Data Bank)
PME	Particle mesh Ewald
PNA	Peptid-Nukleinsäure (peptide nucleic acid)
RAM	Random-Access Memory
REDDB	RESP ESP charge DDataBase
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
SHBG	Sex hormone-binding globulin
SOL	solvent molecules
SPC	Single Point Charge
ssDNA	Einzelstrang DNA (single-stranded DNA)
StAR-Protein	steroidogenic acute regulatory protein
T	Thymin

TIF2	Transcriptional intermediary factor 2
TiO ₂	Titandioxid
U	Uracil
XML	erweiterbare Auszeichnungssprache (Extensible Markup Language)

V. Vorwort

„Unsere größte Schwäche liegt im Aufgeben.
Der sichere Weg zum Erfolg ist immer,
es doch noch einmal zu versuchen.“

Thomas Alva Edison (*1847 – † 1931)

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken die immer an meiner Seite sind und mich bei meiner Masterarbeit unterstützt haben.

Herr Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde ist ein Beispiel für Arbeitsausdauer. Mein Mentor stand mir mit wertvollen Ideen zu Seite und wir konnten stets Themenübergreifende Lösungsansätze finden. Er hat viel für mich möglich gemacht.

Florian, ich Danke Dir für fünf Jahre gemeinsames Studium und weit darüber hinaus.

Danke auch an Herrn Dipl.-Informatiker (FH) Marcel Scheuche. Er hat die nötige Rechenkapazität verfügbar und die Zugänge darauf möglich gemacht.

Ich danke meiner Freundin Sarah die mich in den schwierigen Momenten mit aufbauenden Worten wieder auf die Spur gebracht hat. Sie hat unseren Sohn behütet, ihn stark gemacht und Freiraum für Entwicklung geboten. Des weiteren möchte ich hier meinen Eltern danken. Sie haben mir immer gut zugesprochen und sind immer für mich da. Außerdem danke ich meinem großem Bruder Robert und meiner kleinen Schwester Elisa. Sie haben mir immer Freude bereitet und ich konnte mich in ihrer Gegenwart immer gut erholen.

Ein großes Dankeschön geht an dieser Stelle noch an Gisela und Gert H. für viele Unterstützungen im Bereich Garten, Hauswirtschaft und viele Fahreinsätze. Ein weiteres Dankeschön geht an Grit und Markus F., sie haben uns den Rücken freigehalten und auch finanziell gestützt.

Meine Sohn Emil Alexander hat mir die Bedeutung von Fortschritt klargemacht, wie man Rückschläge zu seinen stärken macht und wie wichtig es ist eigene Wege zugehen.

1 Einleitung

1.1 Motivation

Das Thema der vorliegenden Masterarbeit wurde in einer Kollaboration mit dem TU Dresden Institut für Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik durchgeführt. Das Institut zeichnet sich durch die Verknüpfung von ingenieurtechnischen Wissenschaften mit naturwissenschaftlichen Disziplinen aus. Die Lebensmitteltechnik setzt sich mit der gesamten Verarbeitungskette vom landwirtschaftlichen Rohstoff auseinander. Die Bioverfahrenstechnik beschäftigt sich hingegen vordergründig mit biotechnischen Verfahren als bevorzugtes Mittel für produkt- und produktionsintegrierten Umweltschutz.

Der Fokus bei der Zusammenarbeit lag auf der Entwicklung einer neuartigen Filtermethode, die in der Lage ist, Trinkwasser von Arzneimitteln und deren Rückständen zu entfernen. Im Mittelpunkt stand zunächst die Filterung des endogene Sexualsteroidhormon 17β -Estradiol (E2).

Trinkwasser ist eine der wichtigsten Ressourcen und Nahrungsquelle. Die Trinkwasserqualität hat für die Gesundheit von Mensch und Tier die höchste Priorität. Aus diesem Grund muss die Qualität kontinuierlich geprüft und überwacht werden. Die Beseitigung von schädlichen und gesundheitsgefährdenden Substanzen muss lückenlos sichergestellt werden. Dennoch werden immer häufiger Arzneimittel und pharmakologisch wirksame Stoffe in Gewässern und Böden detektiert.

Bisherige Filteranlagen können die rückstandslose Entfernung von Pharmaka und deren Rückstände aus den Oberflächen-, Grund- und Trinkwässern nicht gewährleisten. Dadurch gelangen diese in meist unbekannter Konzentration in das Wasserkreislaufsystem und damit in die Umwelt. Es bestehen gravierende technische Hürden bei der Filterung von wenigen Nanometer großen Molekülen.

Jedes Jahr gelangen mehrere hundert Tonnen Pharmaka durch inadäquate Entsorgung sowie menschliche und tierische Exkretionen in Abwässer und Umwelt. Die negativen ökologischen Auswirkungen durch den massiven Einsatz von Medikamenten und Pharmaka sind bekannt und werden immer häufiger in den Medien publiziert.

Neuartige Technologien, welche die Filterung dieser schädigenden Moleküle und gleichzeitig kostengünstige Lösungen bieten, werden gesucht und von Verbrauchern gefordert. Durch molekulare Grundlagenforschung soll eine neuartige Filtertechnologie entwickelt werden, die in der Lage sein wird, spezifische Moleküle aus Gewässern restlos zu entfernen und damit die vorhandene Gewässerbelastung durch Arzneimittelrückstände zu reduzieren.

Eine DNA-Aptamer-basierte Technologie ist eine effiziente Applikation zur Entfernung von niedermolekularen Verbindungen. Aptamere ermöglichen eine hochspezifische Molekülbindung und können charakteristisch für jede Art von Molekülen synthetisch hergestellt werden. Durch diese Methode kann eine chemische Bindung zwischen dem Aptamer und der zu detektierenden Substanz bereitgestellt werden. Ein robusterer Ansatz kann durch die Verwendung von Peptid-Nukleinsäure (engl. peptide nucleic acid, abk. PNA) erzielt werden, da diese resistent gegen in der Natur vorkommende Nukleasen ist.

1.2 Problemstellung

Die Industrie der Abwasseraufbereitung sowie Abwasserreinigungsanlagen (ARA) kann mit bisherigen Methoden eine vollständige Eliminierung von pharmazeutische- und persistenten Hormonerückständen in Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser nicht bewältigen [Korner et al., 2001, Spengler et al., 2001]. Die eingesetzten Technologien sind für Filterungen im Nanometerbereich nicht ausgelegt, daher passieren Pharmaka und deren Rückstände die Abwasserfilterungsphasen. Der exzessive Verbrauch von chemischen Produkten in unterschiedlichsten Anwendungsgebieten und die Nichtentfernbarkeit beunruhigt die Öffentlichkeit, Industrie und Regierung [Li, 2014]. Die Effekte sind weitreichend und auch in geringsten Konzentration in Trinkwasser merklich. Die organische Verschmutzung entsteht durch gebräuchliche Pharmaka. Zu diesen zählen unter anderem: Analgetika, Antibiotika, kardiovaskuläre Medikamente, Antiepileptika, Hormone und endokrine aktive Medikamente [Jobling et al., 1995, Li, 2014].

Durch den menschlichen Körper werden diese Substanzen in Abhängigkeit ihrer Pharmakokinetik als Metabolit, in Form von Konjugaten oder unverändert ausgeschieden [Bergmann et al., 2011]. Die vorschriftsgemäße Haltung von Tieren in der Landwirtschaft, sieht den Einsatz von Pharmaka aus der Veterinärmedizin vor. Diese gelangen folglich über Ausscheidungen der Weidetiere in die Umwelt. Die wirtschaftliche Weiterverwendung der Tierexkremente als Dünger, der auf landwirtschaftlichen Flächen aufgetragen wird, trägt zum Schadstoffeintrag in das Ökosystem bei [Götz, 2012]. Die ökologischen Auswirkungen der permanenten Polyintoxikationen sind noch nicht erforscht. Die pharmakologisch wirksamen Stoffe wurden bisher nur isoliert betrachtet.

Die Politik reagiert auf diese Situation mit verschärften Richtlinien. Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union (EU) publizierte im Juli 2013 erstmalig in der Richtlinie im Bereich der Wasserpolitik im Amtsblatt der EU drei Medikamente die unter Beobachtung stehen. Zu diesen zählt das Schmerzmittel Diclofenac sowie die Hormone 17α -Ethinylestradiol (EE2) (synthetisches Estrogen) und 17β -Estradiol (E2) (natürlichen Estrogen) [European Union, 2013]. Die Hormone wurden auf Grund der schädigenden Wirkung auf Flora und Fauna auf die Überwachungsliste gesetzt [Kidd

et al., 2007]. Im späteren Verlauf der Beobachtungsphase können die Medikamente auf die Liste der prioritäre Stoffe hinzugefügt werden.

1.3 Zielstellungen

Ziel der Masterarbeit war es innovative und technische Methoden in Erfahrung zu bringen, die es ermöglichen E2 aus kontaminiertem Trinkwasser zu entfernen. Es sollte ein Aptamer-basiertes Verfahren konzipiert und validiert werden, das ein Anbinden des Hormons an das Aptamer und somit eine Abreinigung ermöglicht.

Vorbereitend dazu wurden das Hormon E2 und das bereits 2007 durch KIM ET AL. detektierte Aptamer charakterisiert. Mittels [Molekulardynamik](#) (MD) wurde eine Modellierung des Aptamers und Analysen der Faltungsdynamik durchgeführt. Anschließend sollte die spezifische Ligand-Bindung von E2 durch [Induced-Fit](#) Mechanismus *in silico* beobachtet werden, um die Kenntnis und Rückschlüsse auf vorhandene Bindungsarten, -stellen und -affinitäten zu erhalten. Des Weiteren sollte ein MD mit der robusteren einzelsträngigen PNA generiert werden, damit mögliche Bindungsstellen identifiziert werden können.

Um die Allgemeingültigkeit des Aptamer-basierte Verfahrens nachzuweisen und auf weitere Hormone sowie [endokrine Disruptoren](#) anzuwenden, wurde eine Klassifizierung der in Trinkwasser vorkommenden Pharmaka nach chemischen Eigenschaften vorgenommen. Durch intensive Literaturrecherche konnte eine Liste von Hormonen und endokrin wirksamen Substanzen aufgestellt werden. Die anschließende Gruppierung der in Trinkwasser beobachteten Substanzen diente in diesem Kontext zur Identifizierung weiterer möglicher Bindungspartner.

2 Grundlagen und Vorbetrachtung

2.1 Trinkwasserversorgung

Die eingetragenen Arzneimittel und deren Metabolite gelangen teilweise ungefiltert in den Trinkwasserkreislauf, da eine rückstandslose Filterung nicht gewährleistet werden kann. Dabei sollte nicht außer acht gelassen werden, dass alle Bezugsquellen von der Kontamination durch pharmakologisch wirksame Stoffe zu unterschiedlichen Anteilen betroffen sind. Die weltweite Trinkwasserversorgung wird über verschiedene Pfade realisiert. Bezogen wird das Trinkwasser aus Oberflächengewässer, Rohrleitungen, bedenklichen und verbesserten Quellen [[World Health Organization, 2014](#)].

Als Oberflächenwässer werden offene, ungebundene und auf der Erdoberfläche gelegene Wasser, wie nicht versickertes Niederschlagswasser oder Seen und Flüsse, deklariert. Unter die Kategorie Rohrleitungen, werden Wasserversorgungssysteme zusammengefasst, die Trinkwasser direkt in die Haushalte verteilen. Quellen die keinen Schutz vor externe Verunreinigungen bieten, gelten als bedenkliche Trinkwasserquellen. Als Verbesserte Trinkwasserquellen werden wiederum Quellen deklariert, die geschützt, jedoch öffentlich zugänglich sind [[World Health Organization, 2014](#)]. Die Abbildung 2.1 zeigt den Anteil der globalen Trinkwasserversorgung in den Jahren 1990 und 2012, unterteilt in die bereitgestellten Trinkwasserquellen.

Im Jahr 1990 konnten insgesamt 76 % der Weltbevölkerung Trinkwasser aus kontrollierten Quellen beziehen. Davon wurden alleine 45 % über Rohrleitungen beliefert. 89 % der weltweiten Bevölkerung haben im Jahr 2012 Trinkwasser aus kontrollierten Quellen bezogen. Davon wurden 56 % direkt über Rohrleitungen mit Trinkwasser versorgt. 2012 bezogen relativ betrachtet 17,11 % mehr Menschen, der Weltbevölkerung, Trinkwasser aus geprüften Quellen. Gleichzeitig ist der Anteil an bedenklichen Trinkwasserquellen relativ um 47,05 % und der Anteil an verbesserten Trinkwasserquellen relativ um 71,43 % gesunken.

Die Konzentrationen pharmakologisch wirksamer Stoffe ist in bedenklichen Trinkwasserquellen, speziell in Flüssen und Seen am höchsten, da keine Filterung durchgeführt wird. Besonders kritisch sind die polaren Metabolite, deren Mobilität im Grundwasser als hoch eingeschätzt wird [[Hembrock-Heger, 2007](#)]. Die Konzentration in kontrollierten Gewässern ist geringer, durch die Filterungsphasen bleibt ein Anteil in den ARA.

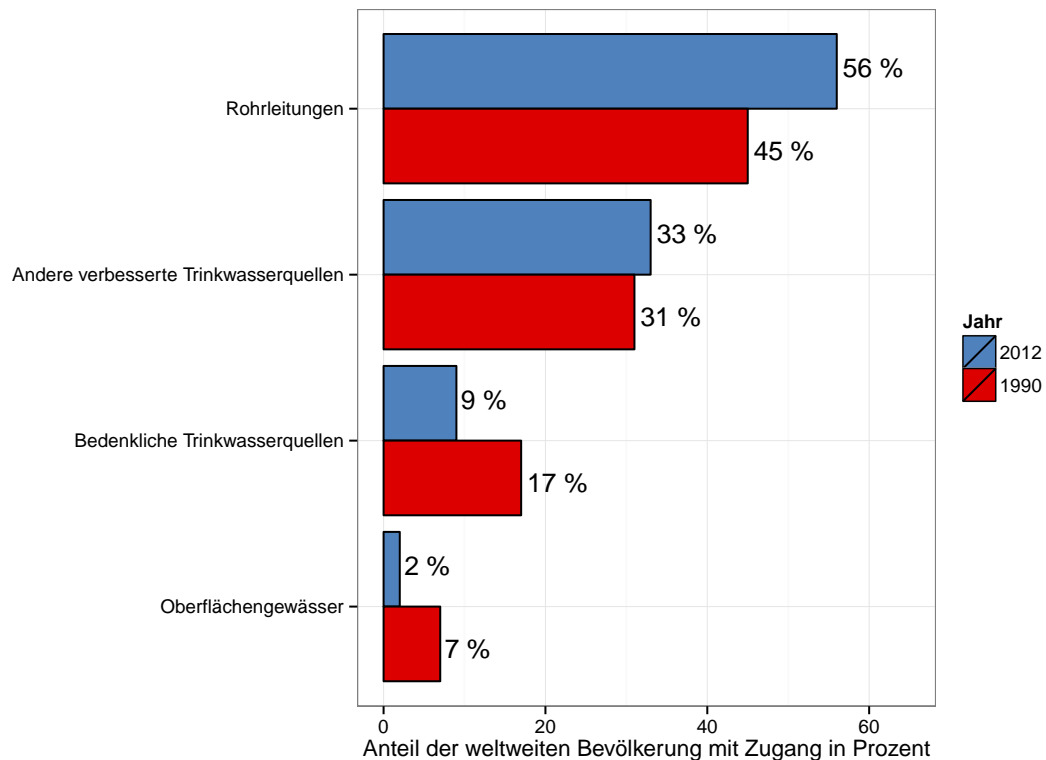


Abbildung 2.1: Globale Trinkwasserversorgung nach Quellart des bereitgestellten Trinkwassers im Jahresvergleich 1990 und 2012 [World Health Organization, 2014].

2.2 Häufige Pharmaka

Die häufigsten Arzneistoffgruppen und deren Verbrauchsmenge werden im Folgenden vorgestellt. Im Jahr 2009 wurden in Deutschland 131 Pharmaka (Verbrauchsmenge > 5 t) mit einer Gesamtmenge von 7.089,48 t verbraucht [Bergmann et al., 2011].

2.2.1 Analgetika

Analgetika sind Schmerzmittel, die narkotische Analgetika, nicht-narkotische Analgetika und nicht-steroidale Entzündungshemmer (NSAID) einschließen. Sie wirken auf verschiedene Weisen auf das Peripherie- und Zentralnervensystem und werden häufig verwendet, um den gegenwärtigen Schmerz in fast allen Krankheiten zu lindern [Bueno et al., 2012]. Weitverbreitete nicht-narkotische Analgetika schließen Paracetamol und Aspirin ein. Narkotische Analgetika schließen Kodein, Methadon, Morphin und Oxycodon ein. Zu den NSAID gehören ebenfalls Diclofenac, Fenoprofen, Ketoprofen, Mefenaminsäure, Indometacin, Naproxen und Ibuprofen [Nicholas-Bateman, 2012].

Die Analgetika Verbrauchsmenge ist 2009 (2.646,85 t) im Vergleich zu 2002 (2.101,79 t) um 25,93 % gestiegen. Die jährliche Wachstumsrate von 2006 (2.393,09 t) bis 2009 be-

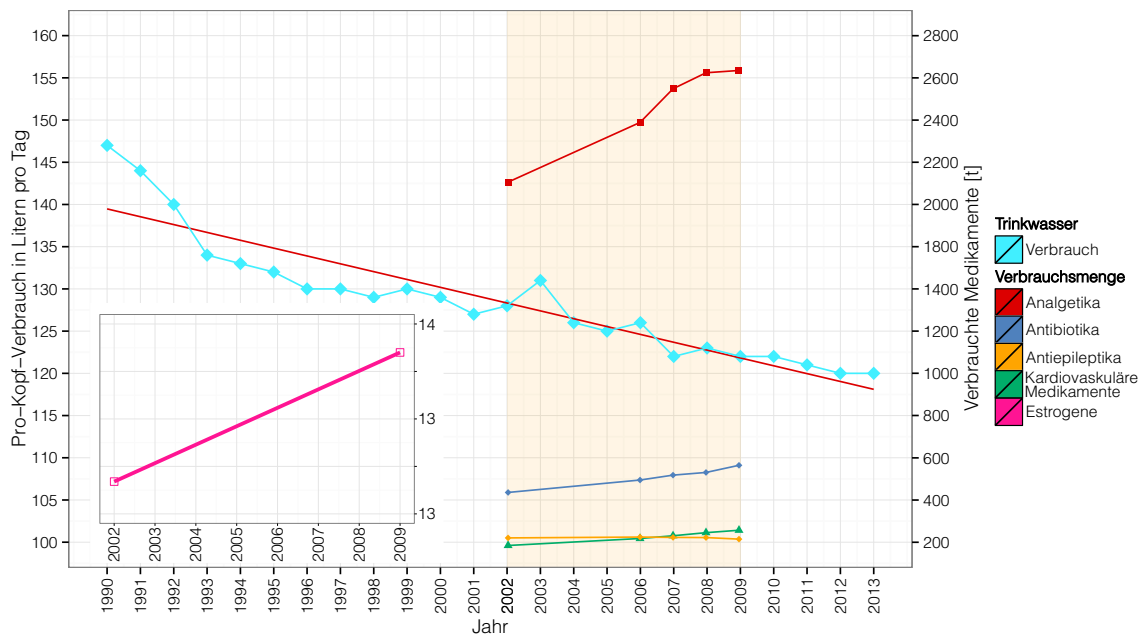


Abbildung 2.2: Jahresüberblick des Trinkwasser Pro-Kopf-Verbrauchs in Deutschland von 1990 bis 2013 gegenüber häufig verbrauchter Medikamente von 2002 und von 2006 bis 2009 [World Health Organization, 2014, Bergmann et al., 2011]. Linke Seite zeigt den Pro-Kopf in Liter pro Tag, rechte Seite den Medikamentenverbrauch in Tonnen.

trug 2,55 % [Bergmann et al., 2011]. Abbildung 2.2 zeigt die verbrauchte Menge an Analgetika in den Jahren 2002 und 2006 bis 2009.

2.2.2 Antibiotika

In den späten 1930ern wurde natürliches und synthetisches Antibiotikum eingeführt. Der Gebrauch hat seitdem beim Menschen und in der Tierproduktion stetig zugenommen [Li, 2014]. Antibiotika werden in mehr als 10 unterschiedliche Klassen eingeteilt, zu diesen gehören unter Anderem: β -Lactam-, Makrolid-, Fluoroquinolon-, Aminoglykosid-, Sulfonamid- und Tetracyclin-Antibiotikum. Amoxicillin und Penicillin gehören zur Antibiotikaklasse β -Lactam und sind die meist eingesetzten Antibiotika in der Humanmedizin [Huang et al., 2001]. In der Veterinärmedizin wird Antibiotikum genutzt, um Krankheiten zu behandeln oder Leistungsfähigkeit bei der Futteraufnahme zu steigern sowie Wachstumsraten, zum Beispiel in Garnelen-Brutplätzen zu verbessern [Sarmah et al., 2006].

Die Menge an verbrauchten Antibiotika betrug 2002 438,4 t und 2009 571 t. Des entspricht einer Zunahme von 30,25 %. Ein jährliche Wachstumszunahme von 3,42 % wurde in den Jahren von 2006 (499,1 t) bis 2009 beobachtet [Bergmann et al., 2011]. In Abbildung 2.2 werden die Verbrauchsmengen der Jahre 2002 und 2006 bis 2009 gegenübergestellt.

2.2.3 Antiepileptika

Carbamazepin ist eines der Antiepileptika, die am häufigsten in deutschen Oberflächen-gewässern detektiert wurden [Zhang et al., 2008]. AMORE ET AL. hat bereits 1997 entdeckt, dass die entstehenden Metabolite durch das aufgenommene Carbamazepin **reprotoxische Effekte** zur Folge haben [Amore et al., 1997].

Ausgehend vom Jahr 2002 (173,01 t) nahm die Verbrauchsmenge an Antiepileptika gegenüber dem Jahr 2009 (247,36 t) um 42,97 % zu. Die jährliche Wachstumsrate betrug 4,54 % in den Jahren von 2006 (207,1 t) bis 2009 [Bergmann et al., 2011]. Die Gegenüberstellung der verbrauchten Mengen wird in Abbildung 2.2 gezeigt.

2.2.4 Kardiovaskuläre Medikamente

Antihypertonika Medikamente werden verwendet, um den Bluthochdruck zu behandeln. Es gibt viele Arten von Antihypertonika. Zu diesen zählen unter anderem β -Blocker (Bisoprolol, Metoprolol), Kalziumkanalblocker und das harntreibende Medikament Diuretikum [Li, 2014].

Entgegengesetzt der bisher betrachteten Stoffgruppen sind die Verbrauchsmengen der kardiovaskulären Medikamente, speziell β -Blocker, von 2002 (210 t) bis 2009 (204,1 t) um 2,3 % gesunken. Auch die jährliche Wachstumsrate von 2006 (214,06 t) bis 2009 waren zu 1,18 % rückgängig [Bergmann et al., 2011]. In Abbildung 2.2 sind die Verbrauchsmengen von 2002 und 2006 bis 2009 aufgeführt.

2.2.5 Estrogene und hormonelle Verbindungen

Auf Grund der häufigen Verwendung und deren bedenklichen Einflüsse auf Menschen und Tiere, gehören hormonelle Verbindungen zu den wichtigen Arzneimittelklassen [Sarmah et al., 2006, Huy et al., 2011]. Zu den wichtigsten natürlichen Estrogenen gehört das E₂, Estrone (E₁) und Estriol (E₃). E₂ ist das potenteste natürliche Estrogen und wird zu therapeutischen Zwecken eingesetzt [Lüllmann et al., 2006]. Eines der wichtigsten synthetischen Estrogene ist EE₂, welches für Empfängnisverhütung bei Frauen verwendet wird. Es verursacht kritische Wirkungen auf die Umwelt und führt zur **Feminisierung** von männlichen Fischen [Li, 2014, Kidd et al., 2007]. Estrogene kommen in der Humanmedizin bei der Hormonsubstitutionstherapie zum Einsatz. Dieses wird bei Therapien gegen kardiovaskuläre Krankheiten, Inkontinenz, Alzheimer und anderen neurodegenerativen Krankheiten sowie Osteoporose angewandt [Cornwell et al., 2004].

Innerhalb der Jahre 2002 bis 2009 wurden insgesamt 42 Wirkstoffe der Kategorie "Sexualhormone und andere Modulatoren des Genitalsystems" (CPV-Code: 33641300-8) ver-

äußert. Diese sind der Kategorie "Urogenitalsystem sowie Sexualhormone" (CPV-Code: 33641000-5) zugehörig. In diesen Jahren ist die Verbrauchsmenge um 11,02 % (Jahr 2002: 12,34 t und 2009: 13,7 t) gestiegen [Bergmann et al., 2011]. In Abbildung 2.2 sind die Verbrauchsmengen von 2002 und 2006 bis 2009 aufgeführt. Die Verbrauchsmenge an E2 ist jedoch von 2002 (91,2 kg) bis 2009 (57,2 kg) um 37,28 % gesunken. Die Wachstumsrate der Verbrauchsmenge des synthetische EE2 hat sich ebenfalls um 48,6 % verringert, 2002 wurden noch 22,9 kg und 2009 12 kg verbraucht. Im Gegensatz dazu war die Verbrauchsmenge von E3 2009 (75,6 kg) 3,99 % höher, als im Jahr 2002 (72,7 kg) [Bergmann et al., 2011].

2.3 Eintragspfade von Arzneimitteln

Bei Eintragsquellen von Arzneimitteln in die Umwelt wird in Punkt- und in Verzweigtequellen unterschieden. Zu den Haupteintragspfaden zählen unter anderem Industrieabwässer, Krankenhausabwässer und Kläranlagen. Dabei sind Klärgruben Punktquellen für den Eintrag in den Boden und Gewässern. Die Identifikation von verzweigten Eintragspfaden ist schwierig, da diese über breiten geografischen Maßstäben auftreten [Lapworth et al., 2012]. Eines der Beispiele sind Abflüsse, einschließlich landwirtschaftliche Abwässer, tierische Exkremente und Gülle, kommunale Abwässer und die Leckagen aus der ARA und Abwasseraufbereitung [Bueno et al., 2012]. Abbildung 2.3 zeigt die Haupteingangspfade und die Verzweigungen der Nebeneintragspfade von medizinischen Produkten.

Die Umweltrelevanz eines pharmakologisch wirksamen Stoffes ist abhängig von der Menge, die vom Körper wieder ausgeschieden wird. Gleichmaßen werden auch deren Metabolite betrachtet. Nach ordnungsgemäßer Anwendung werden Pharmaka im menschlichen sowie tierischen Organismus unverändert, teilweise oder vollständig metabolisiert ausgeschieden [Bergmann et al., 2011]. Die Umweltbelastung von Oberflächen- und Grundgewässern mit pharmakologisch wirksamen Stoffen, stellt eine Bedrohung für die Flora und Fauna der aquatischen Umwelt dar [Kidd et al., 2007]. Diese Einflüsse können chronische Toxizität und akute Vergiftungen bei Wasserorganismen auslösen. Des Weiteren kann es zur Veränderung und Zerfall von Biotopen, Akkumulation von Pharmaka und deren Rückständen im betroffenen Ökosystem sowie Benachteiligung der Artenvielfalt führen [European Union, 2013].

2.3.1 Punktquellen

Kommunale Deponien sind die Quelle einer Vielzahl von chemischen Kontaminationen, die in die Umwelt eingetragen werden und auf Gesundheit von Mensch und Tier einwirken. Ferner können kommunale Deponien Sickerwasser erzeugen, die erhebliche Mengen von gelösten organischen Substanzen, Schwermetallen und anderen Verunrei-

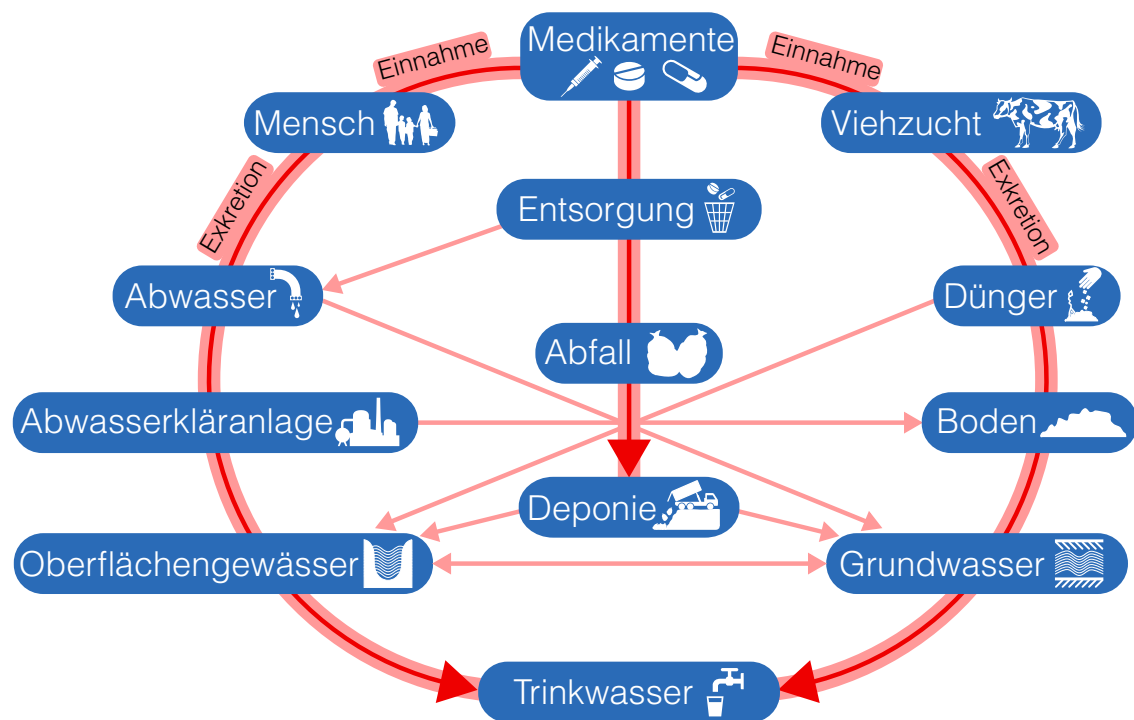


Abbildung 2.3: Schematische Übersicht der drei Haupteintragspfade (schattierte Pfeile) und deren Nebeneintragspfade (nichtschattierte Pfeile) von medizinischen Produkten ins Trinkwasser. [Ternes, 1998].

nigungen enthalten. Dabei existieren mehrere Arten von Verunreinigungen, z.B. Hormone, Pharmaka und Flammenschutzmittel, die im Brackwasser der Mülldeponien gefunden wurden. Das Brackwasser gelangt durch lange Liegezeiten in das Grundwasser oder wird in Oberflächengewässer abgelassen [Li, 2014].

Abwässer sind, neben den kommunalen Deponien, eine weitere Punktquelle im Hinblick auf den Eintrag in die aquatische Umwelt. Die meisten Abwässer werden durch die Kanalisation in ARA abgeführt. Dabei gelangen einige durch Freisetzung von Körperpflegeprodukte beim Baden oder Schwimmen direkt in die Umwelt. Nicht alle Arzneiprodukte werden komplett verstoffwechselt und gelangen ebenfalls in die Abwässer und sind daher eine weitere Ursache für den Eintrag in die aquatische Umwelt. Krankenhaus- und industrielle Abwässer zählen zu den Hauptquellen, auch scheinbar unbedeutende einzelne Haushalt tragen zur ökonomischen Belastung bei [Li, 2014].

2.3.2 Verzweigtequellen

Pharmakologisch wirksame Stoffe gelangen auf verschiedene Wege in Boden und Gewässer. Zu den verzweigten Quellen zählen landwirtschaftliche Abwässer, wie Gülle und Dünger, Regenwasser sowie städtische Abwässer und undichte Stellen im Abwassersystem [Lapworth et al., 2012]. Klärschlamm, der Rückstand aus dem Abfall-

verwertungswasser, wird auf Grund des hohen Nährstoffgehalts, auf landwirtschaftliche Nutzflächen aufgetragen. Jedoch wurden einige der Schadstoffe unverändert oder nur unvollständig von den ARA entfernt [Li, 2014].

2.4 Eintragspfade von Estrogenen

Hormone können in die Umwelt durch Punktquellen (z. B. Abwässer aus Kläranlagen) und Verzweigtenquellen (z. B. Oberflächenabwässer aus landwirtschaftlichen Betrieben), durch menschliche und tierische Ausscheidung eingebracht werden [Hamid and Eskicioglu, 2012]. Wie in Abbildung 2.4 dargestellt, erreichen die natürlichen und synthetischen Hormone und deren Metaboliten nach Ausscheidung die Kläranlage. Sowohl die behandelten Feststoffe als, auch die Flüssigkeiten des Zufluss-Abwassers, stellen potentielle Eintragspfade in die Umwelt dar [Hamid and Eskicioglu, 2012].

Die drei Estrogene E1, E2 sowie E3 kommen im menschlichen Organismus vor und sind Derivate vom Cholesterin [Kleine and Rossmann, 2013]. Die durchschnittliche tägliche Ausscheidungsrate der drei natürlichen Steroidhormone wird in der Tabelle 2.1 gegenübergestellt [Johnson et al., 2000].

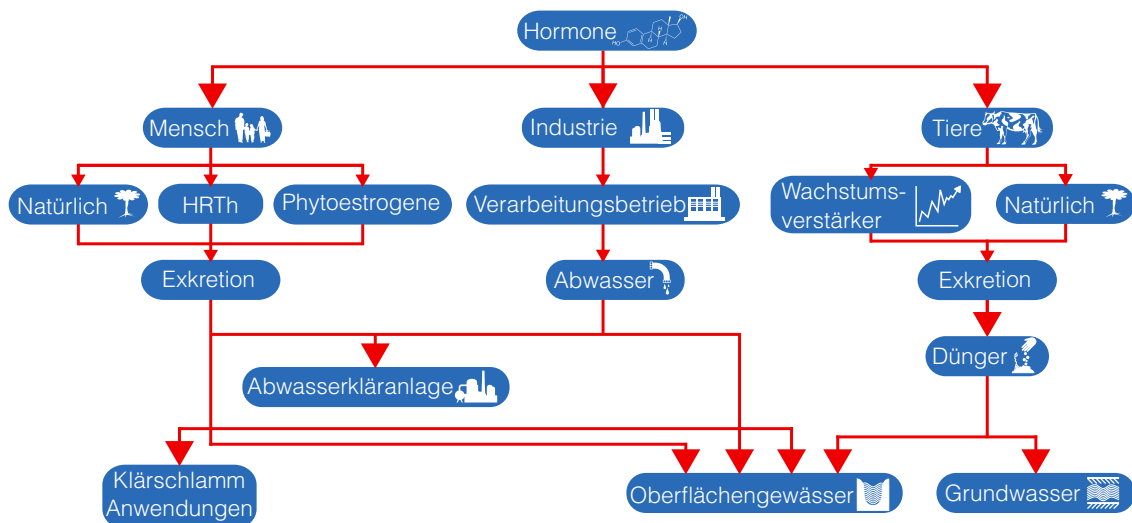


Abbildung 2.4: Quellen und deren Pfade von Steroidhormonen Einträgen in die Umwelt (HRTh: Hormonersatztherapie) [Hamid and Eskicioglu, 2012].

2.4.1 Estrogene in Abwasserreinigungsanlagen

Die im ARA gereinigten Abwässer werden geklärt in Flüsse eingeleitet, persistente organische Substanzen werden verdünnt und von den im Wasser lebenden Organismen kontinuierlich aufgenommen [Ying et al., 2002]. Die Messungen aus Deutschland sind in Tabelle 2.2 dargelegt.

Tabelle 2.1: Geschätzte menschliche Estrogen Ausscheidung (pro Person) in $\mu\text{g}\cdot\text{Tag}^{-1}$ [Johnson et al., 2000].

Klientel	Phasen	E1	E2	E3	Total
Frauen	Ovarialzyklus	3,5	8,0	4,8	16,3
	Schwangerschaft	259,0	600,0	6.000,0	6.859,0
	Postmenopause	2,3	4,0	1,0	7,3
Männer		1,6	3,9	1,5	7,0

Tabelle 2.2: Estrogen Konzentration in $[\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}]$ in Abwasserreinigungsanlagen (Deutschland) [Ying et al., 2002].

Verbindung	Abwasserreinigungsanlagen $[\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}]$
E1	<0,1 - 18,0
E2	<0,15 - 5,2
E3	-
EE2	<0,1 - 8,9

2.4.2 Estrogene in Oberflächengewässern

Oberflächengewässer werden durch Einträge aus Abflüssen der ARA sowie Auswaschungen landwirtschaftlicher Nutzflächen belastet [Bergmann et al., 2011]. Im Ozean wurde eine E1-Konzentration von 1,0 bis 2,0 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ detektiert [Atkinson et al., 2003]. Die gemessenen Konzentration aus Deutschland sind in Tabelle 2.3 dargelegt.

Tabelle 2.3: Estrogen Konzentration in $[\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}]$ im Oberflächengewässern (Deutschland). [Ying et al., 2002]

Verbindung	Oberflächengewässer $[\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}]$
E1	0,1 - 4,1
E2	0,15 - 3,6
E3	-
EE2	0,1 - 5,1

2.4.3 Estrogene im Grundwasser

Arzneimittel aus der Humanmedizin werden über Oberflächenwasser, durch undichte Stellen in der Kanalisation, Abwasserverrieselung oder Sickerwasser aus Deponien ins Grundwasser eingetragen. Pharmaka aus der Veterinärmedizin gelangen durch Exkretion von Weidetieren sowie über aufgetragenen Wirtschaftsdünger auf landwirtschaftliche Nutzflächen und in der Folge der Auswaschung ins Grundwasser [Bergmann et al., 2011]. Die Messungen aus Deutschland sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4: Estrogen Konzentration in $[\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}]$ im Grundwasser (Deutschland) [Hembrock-Heger, 2007].

Verbindung	Grundwasser $[\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}]$
E1	-
E2	>0,1 - 1,0
E3	-
EE2	0,1 - 2,3

2.4.4 Estrogene im Trinkwasser

Im Trinkwasser treten die organischen Wirkstoffe auf, die bei der Aufbereitung von Grund- oder Oberflächenwasser nicht restlos entfernt wurden. Diese umweltrelevanten Wirkstoffe werden auf Grund der hohen Persistenz, ähnlich wie im Grundwasser, im Trinkwasser beobachtet [Hembrock-Heger, 2007].

Tabelle 2.5: Estrogen Konzentration in $[\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}]$ im Trinkwasser (Deutschland) [Hembrock-Heger, 2007].

Verbindung	Trinkwasser $[\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}]$
E1	-
E2	>0,1 - 0,9
E3	-
EE2	0,1 - 2,3

2.5 Biologische Grundlagen

2.5.1 Hormone

Signalmoleküle, die in geringen Mengen von einem Teil des Organismus produziert und in einen anderen Teil des Organismus transportiert werden, wo sie anschließend an einen spezifischen **Rezeptor** binden und in Zielgewebe und -zellen Reaktionen hervorrufen, werden als Hormone bezeichnet [Campbell and Reece, 2009]. Bei Wirbeltieren werden diese durch das **Kreislaufsystem** transportiert. Die chemischen Botensubstanzen, die von endokrinen Zellen ins Blut übergehen, werden über das **Endokrine System** im Körper verteilt [Campbell and Reece, 2009]. Produzierte Hormone werden beim Transport durch das Blut durch Enzyme abgebaut. Daher werden diese durch konzentrierte Aktion vieler Zellen simultan freigesetzt (Pulsen von Hormonen) [Kleine and Rossmann, 2013]. Die Diversität der unterschiedlichen Hormone, die verschiedenartige Wirkungen hervorrufen, ist hoch. Zellen der Zielorgane, die mit Rezeptoren für betreffende Hormone ausgestattet sind, können diese aufnehmen und Reaktionen hervorrufen. Die Rezeptoren müssen dafür intra- oder extrazellulär angeordnet sein. Ausgelöste hormonelle Wirkungen können längere Zeiträume überdauern (sekunden-, minuten- und

stundenlang), da die chemischen Botensubstanzen im Blutstrom verweilen und wiederholt einwirken [Campbell and Reece, 2009]. Hormone sind für zahlreiche Aufgaben im Organismus verantwortlich. Sie sind Vermittler bei Reaktionen auf Umweltreize, erhalten das Gleichgewicht der **Homöostase** und sind Regulationsfaktoren bei Entwicklung, Fortpflanzung und Wachstum [Campbell and Reece, 2009].

Hormone werden in drei Stoffklassen gruppiert: Proteine und Peptide, Amine und Steroide. Proteohormone und Peptidhormone einigen Hormone, die den Zuckerhaushalt (Insulin), den Blutdruck (Angiotensin) und die Fortpflanzung (Gonadotropine) regulieren [Campbell and Reece, 2009]. Dazu gehören gleichermaßen Freisetzungshormone, die Hormon produzierende Zellen steuern. Weiterhin zählen auch appetitanregende Hormone (Leptin und Neuropeptid Y) zu der Proteohormon und Peptidhormon Stoffklasse [Kleine and Rossmannith, 2013]. Die Proteohormone entstehen wie andere Proteine durch die Proteinsynthese.

Arminhormone sind Hormone, die aus **Aminosäuren** synthetisiert werden. Die Hormone **Adrenalin**, **Noradrenalin**, **Dopamin**, **Triiodthyronin** und **Thyroxin** sind Derivate der Aminosäure **Tyrosin** [Campbell and Reece, 2009, Kleine and Rossmannith, 2013]. Durch stufenweise Modifizierung der Aminosäure **Tryptophan** entstehen **Serotonin** und **Melatonin** [Kleine and Rossmannith, 2013].

Steroidhormone, wie das Sexualhormon E2, sind Lipide und Derivate des Steroids Cholesterin, welches wiederum in biochemischer Umwandlung aus **Squalen** entsteht [Kleine and Rossmannith, 2013]. Das Kohlenstoffgrundgerüst aller Steroidhormone ist das polyzyklische Steran, welches sich aus vier kondensierten Ringen, davon drei sechsgliedrigen und einem fünfgliedrigen Ring zusammensetzt. Untereinander sind die Steroide an Hand der funktionellen Gruppen unterscheidbar, die an verschiedenen Positionen am Ringsystem gebunden sind, sowie am Sättigungsgrad der kondensierten Ringe [Kleine and Rossmannith, 2013]. Dadurch erhalten sie einen individuellen chemischen Charakter und damit eine spezifische Wirkungsweise [Campbell and Reece, 2009]. Cholesterin ist die Ausgangsverbindung für die **Biosynthese** der Steroidhormone und wird bei Wirbeltieren hauptsächlich in der Darmschleimhaut sowie Leber produziert. In den Steroid bildenden Zellen wird der Transport aus der **Plasmamembran** in die **Mitochondrien**, des Cholesterins über das Steroidogenic acute regulatory (StAR) Protein (regulatorisches mitochondriales Protein) reguliert [Thorsell et al., 2011]. Durch die Cholesterin-Monooxygenase (CYP11A1), die eine Degradation der Seitenkette bewirkt, wird anschließend in den Mitochondrien zu Pregnenolon. Durch nachfolgende Reaktionsabläufe der Steroidogenese werden alle weiteren menschlichen Steroidhormone gebildet, dabei muss das unvollständige Steroid zu den festgelegten Wirkungsorten (Enzyme) wandern [Kleine and Rossmannith, 2013]. Abbildung 2.5 zeigt die Biosynthese des Steroidhormons E2 aus Cholesterin.

Zu den Steroidhormonen gehören die Klassen Mineralocorticoide, Glucocorticoide und

die Geschlechts- bzw. Sexualhormone [Yin et al., 2002]. Mineralocorticoide und Glucocorticoide sind Hormone aus der Nebennirnrinde und die Haupttypen der Corticosteroide [Kleine and Rossmannith, 2013]. Auf den Mineralstoffwechsel wirken sich die Mineralocorticoid Hormone aus. Diese halten unter anderem das Salz- und Wassergleichgewicht aufrecht und können zur Steigerung von Blutdruck und Blutvolumen führen. Glucocorticoide wirken sich hingegen auf den Glucosestoffwechsel aus. Unter anderem wird die Glucosesynthese durch diese Steroide unterstützt, indem Proteine und Lipide zu Glucose abgebaut werden und damit den Blutglucosespiegel erhöht [Campbell and Reece, 2009].

Sexualhormone werden in geringen Mengen von der Nebennierenrinde gebildet. Sie dienen der Ausbildung und Entwicklung der Geschlechtsmerkmale und befähigen den menschlichen Organismus zur Fortpflanzung. Die Sexualhormone der Wirbeltiere werden in drei Stoffklassen eingeteilt: Androgene wie Testosteron, Gestagene wie Progesteron, und Estrogene wie E2 [Campbell and Reece, 2009]. Die Geschlechtshormone Androgene (männlich) und Estrogene (weiblich) sind ausschlaggebend bei der Fortpflanzung. Des Weiteren hängt von diesen Hormonen die Geschlechtsentwicklung, die Keimdrüsenaktivität und die Reifung der Geschlechtsorgane ab [Kleine and Rossmannith, 2013].

Bei männlichen Wirbeltieren werden die Androgene hauptsächlich in den Testikel produziert. Diese fördern die Samenzellbindung, sowie die Entwicklung und Aufrechterhaltung der männlichen sekundären Geschlechtsmerkmale. Estrogene werden bei weiblichen Wirbeltieren in der Ovar produziert und fördern die Ausbildung der Gebärmutter-schleimhaut, sowie die Entstehung und Aufrechterhaltung der weiblichen sekundären Geschlechtsmerkmale [Campbell and Reece, 2009, Gressner et al., 2007]. Progesteron ist einerseits die Vorstufe für Androgene und Estrogene, zum anderen ist es ein Hormon, welches unverzichtbar für die Ovulation und der Aufrechterhaltung der Gestation ist [Kleine and Rossmannith, 2013]. Die drei Steroidklassen sind in unterschiedlichen Mengen bei weiblichen und männlichen Wirbeltiere vorhanden.

Hormone unterscheiden sich nicht ausschließlich durch die Stoffklassen, sie werden ebenfalls nach Löslichkeit klassifiziert. Diese chemische Einteilung ist für das Verständnis der Reaktionswege in Zellen von Bedeutung, da sich die Lage der Rezeptoren für polare und unpolare Hormone unterscheidet. Zu den wasserlöslichen Hormonen zählen unter anderem die Proteohormone und Peptidhormone wie beispielsweise Insulin. Steroidhormone wie Cholesterin und E2 sind Lipide und daher unpolar. Arminhormone können sowohl wasserlöslich (Adrenalin), als auch fettlöslich (Thyroxin) sein [Campbell and Reece, 2009].

Wasserlösliche Hormone binden an Signalrezeptorproteine. Diese lösen an der Plasmamembran eine Folge von Reaktionen aus und führen zum Signalausstoß der Zielzelle. Bei den Reaktionen kann es sich um eine Enzymaktivierung, Modifikation bei Aus-

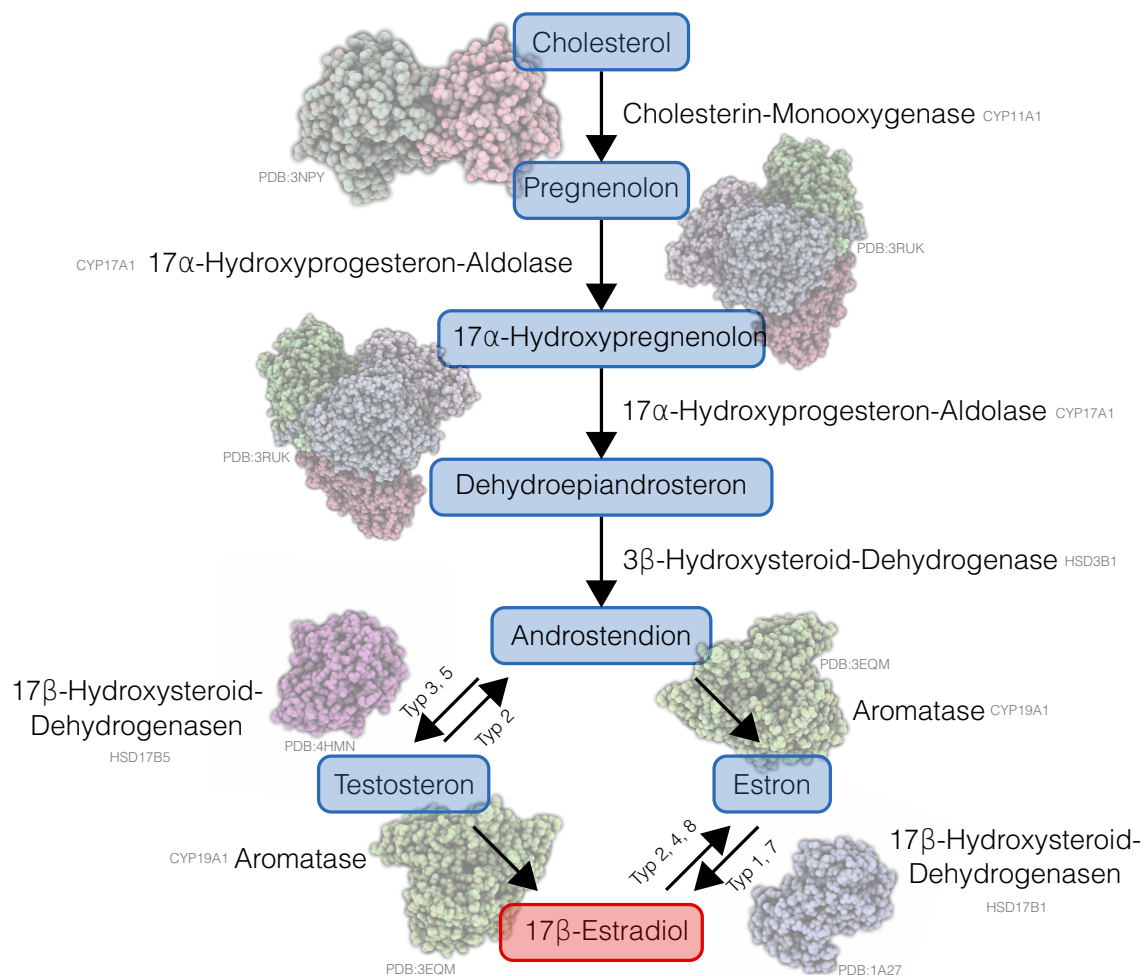


Abbildung 2.5: Ausschnitt aus dem Lipid Stoffwechselweg der Steroid Biosynthese, spez. von 17β-Estradiol (E2) (KEGG pathway:map00140). Mittels StAR wird das Cholesterin von der Zellmembran in die Mitochondrien eingetragen. Anschließend wird Cholesterin durch Spaltung des ersten steroidogenen Enzyms CYP11A1 zu Pregnenolon. Durch Oxidation und Seitenkettenspaltung, durch das Enzym CYP17A1, wird Pregnenolon erst zu 17α-Hydroxypregnenolon und anschließend zu Dehydroepiandrosteron umgesetzt. Daraufhin oxidiert das Enzym HSD3B1 dieses zu Androstendion. Durch HSD17B5 (Enzym der Nebenniererin-de) wird dieses weiterhin zu Testosteron umgewandelt. Das Schlüsselenzym CYP19A1 ist gleichermaßen für die Umwandlung von Testosteron zu E2 und von Androstendion zu Estron (E1) verantwortlich. E1 wird durch das Enzym HSD17B7 zu E2 umgewandelt [Kleine and Rossmanith, 2013].

scheidung oder Aufnahme von Molekülen, sowie Umstrukturierung des Cytoskelettes handeln [Campbell and Reece, 2009].

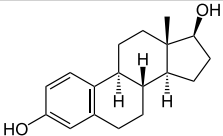
Fettlösliche Steroidhormone diffundieren durch die Membran der endokrinen Zellen ins Blut und werden teilweise mittels Transporterproteinen zum Zielgewebe befördert. Anschließend diffundieren sie in die Zielzelle, aktivieren die intrazellulären Rezeptoren und beeinflussen die Genexpression [Yin et al., 2002]. Rezeptoren, die im Zellkern angelagert sind, werden durch fettlösliche Hormone aktiviert, die kein Steroidhormone

sind [Campbell and Reece, 2009].

2.5.2 17 β -estradiol

E2 ist ein C₁₈-Steroid mit jeweils einer Hydroxylgruppe am 3- β - und 17- β -Position. Die physikochemischen Eigenschaften von E2 werden in Tabelle 2.6 zusammengefasst. E2 hat einen hohen $\log K_{OW}$ und daher eine Tendenz zur Bioakkumulation, einen hohen $\log K_{OC}$ und somit einen hohen Sorptionspotential. Weiterhin hat E2 mit 178,5 °C einen hohen Schmelzpunkt (geringer Dampfdruck). Taxonomisch wird es den Lipiden (Superklasse), genauer den Steroiden und deren Derivaten (Klasse) zugeordnet. Es ist das potenteste Estrogen der Wirbeltier-Steroidhormone und für seine Auswirkungen als endokriner Disruptor bekannt [Yin et al., 2002, Huy et al., 2011]. Die höchste estrogene Aktivität wurde bei einer Konzentration von 0,11 bis 1,7 ng·l⁻¹ festgestellt [Kawasaki et al., 2009]. E2 wird in den Ovarien, durch die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD17B1, HSD17B7) aus E1 und durch die Aromatase (CYP19A1) aus Testosteron, gebildet [Kleine and Rossmannith, 2013]. Die Eierstöcke benötigen das Follikel-stimulierende Hormon (FSH) und luteinisierende Hormone (LH) für die Estrogenproduktion. [Campbell and Reece, 2009]. LH stimuliert die Thekazellschicht. Auf diese Weise wird die Synthese der Androgene sowie des Progesterons gesteigert und sezerniert. Anschließend diffundieren die Androgene (obligate Vorstufe der Estrogene) durch die Basalmembran des Follikels in die Granulosazellschicht. Die Umwandlung von Androgenen in E2 (Aromatisierung) wird durch FSH induziert, d.h. es muss unter Einfluss des FSH, ausreichend Aromatase (CYP19A1) gebildet werden [Leidenberger et al., 2009]. Das Gonadotropine FSH wird unter Kontrolle von Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) von der Hypophyse ausgeschüttet. Gleichmaßen wird durch inhibitorische Kontrolle die Ausschüttung von GnRH und FSH durch Testosteron und E2 reguliert (Feedback-Inhibition) [Kleine and Rossmannith, 2013].

Tabelle 2.6: Physikochemische Eigenschaften des endogenen Steroidhormon E2 beinhaltet: Säuredissoziationskonstante, n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient, Verteilungskoeffizient zwischen organischem Kohlenstoff im Boden/Sediment und Wasser sowie Verteilungskoeffizient zwischen Boden/Sediment und Wasser [Li, 2014]. Die Strukturformel von E2 als Keilstrichformel (engl. Natta Projection) zeigt die räumliche Anordnung der Substituenten.

Verbindung	pK _S	log K _{OW}	log K _{OC}	log K _d	Strukturformel
17 β -Estradiol	10,4	3,9 - 4,0	3,13 - 3,69	2,30 - 2,83	

E2 wirkt auf die charakteristische körperliche Entwicklung beim weiblichen Geschlecht ein und prägt deren psychisches Verhalten [Lüllmann et al., 2006]. Die estrogene Wirkung von E2 ist u.a. prägend bei der Leberfunktion, am zentralen Nervensystem sowie

beim Wachstum von Skelett und Haut [Gressner et al., 2007]. Weiterhin hat es direkten Einfluss auf das Wachstum der Uterusmuskulatur. E2 induziert die Zellproliferation beim Menstruationszyklus bei einer geschlechtsreifen Frau und fördert die Entwicklung der Milchgänge der Mamma [Lüllmann et al., 2006]. Im männlichen Körper wird E2 durch die Aromatase (CYP19A1) aus Testosteron synthetisiert. Das Enzym ist im Testikel, Prostata, Fettgewebe, Gehirn sowie im Knochen, wo es lokal E2 bildet. Die im Plasma von jungen Männern nachgewiesene E2 Konzentration ist vergleichbar mit der Konzentration bei Frauen, wenn diese sich im frühen Follikelstadium befinden. In der pubertären Phase ist der Stoffwechsel des Knochens vom lokal synthetisierten E2 abhängig [Lüllmann et al., 2006]. Tabelle 2.7 stellt die durchschnittliche E2 Konzentration von Frauen, Männern und Kindern gegenüber.

Tabelle 2.7: Durchschnittliche E2 Referenzbereiche (Konzentration) von Frauen in den Phasen des Sexualzyklus sowie in den Trimestern der Schwangerschaft und von erwachsenen Männern [Gressner et al., 2007]. Durchschnittliche E2 Referenzbereiche von 299 Kindern in den Tanner-Stadien I - V [Gassler et al., 2000]. Untersuchungsmaterial Serum, Heparin-Plasma.

Klientel	Phasen	Abschnitt	Konzentration [ng·l ⁻¹]
Frauen	Follikelphase	Tag - 12	11 – 96
	Follikelphase	Tag - 4	63 – 165
	Ovulationsphase	Tag 1	146 – 526
	Lutealphase	Tag + 2	33 – 150
	Lutealphase	Tag + 6	68 – 196
	Lutealphase	Tag + 12	36 – 133
	Postmenopause		< 37
Schwangerschaft	1. Trimester		302 – 6.980
	2. Trimester		1.005 – 17.890
	3. Trimester		4.353 – 17.600
Männer			< 52
Mädchen	Tanner-Stadium I		5 – 10
	Tanner-Stadium II		5 – 115
	Tanner-Stadium III		5 – 180
	Tanner-Stadium IV		25 – 345
	Tanner-Stadium V		25 – 410
Jungen	Tanner-Stadium I		3 – 15
	Tanner-Stadium II		3 – 10
	Tanner-Stadium III		5 – 15
	Tanner-Stadium IV		3 – 40
	Tanner-Stadium VI		15 – 45

Im Körper wird E2 vorwiegend in der Leber inaktiviert. Durch den metabolischen Abbau wird E2 zu E1 und E3, nach anschließender Bindung mit Glucuronsäure oder Schwefelsäure werden die Konjugate besser wasserlöslich und über die Leber renal entfernt [Lüllmann et al., 2006].

Gesundheitliche Auswirkungen

Gesundheitliche Auswirkungen sind im Zusammenhang mit der Belastung bei verschiedenen Fischarten durch estroge Verbindungen bekannt. Diese schließen unter anderem die veränderten sexuellen Entwicklungen, Auftreten von Zwitterspezies und ein verändertes Paarungsverhalten ein. In den Population des Rotauges (*Rutilus rutilus*), aus der Familie der Karpfenfische, die in Flüssen mit eingetragenen kommunalen und Estrogen belasteten Abwässern leben, ist eine hohe Inzidenz von Zwittern bekannt. Die Inzidenz von Zwittern wurde ebenfalls bei der Population des Glasaugenbarsches (*Sander vitreus*), aus der Familie der Percidae (Echte Barsche), festgestellt [Hamid and Eskicioglu, 2012]. Weiterhin wurden bei der Gold-Elritze (*Pimephales promelas*), aus der Familie der Karpfenfische, erhöhte Vitellogenin Werte im Blutplasma beobachtet, nach dem diese mit E1 und E2, bei umweltrelevanten Konzentration 21 Tage ausgesetzt waren [Panter et al., 1998]. Eine kontinuierliche EE2 Belastung, bei umweltrelevanter Konzentration, in einem experimentellen Seengebiet, führte zur Feminisierung der männlichen Gold-Elritze. Diese wurde durch erhöhte Vitellogenin Produktion induziert und löste einen Zusammenbruch der Arten aus [Kidd et al., 2007]. Durch zeitige EE2 Belastung (Konzentration von $9,86 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$) auf die Population der Zebrafische (*Danio rerio*), aus der Familie der Karpfenfische, wurden weibliche Zebrafische weniger umworben. Das führte zu reduziertem Fortpflanzungserfolg [Coe et al., 2010]. Bei den weiblichen Zierschildkröten (*Chrysemys picta*), aus der Familie Neuwelt-Sumpfschildkröten, wurden erhöhte Konzentrationen von Vitellogeninen, durch verabreichtes E2, festgestellt [Irwin et al., 2001]. Dies könnte Auswirkung auf Fortpflanzungsfähigkeit und Energiehaushalt haben. Eine Studie aus dem Jahr 2012 stellte einen eindeutigen Zusammenhang zwischen einem erhöhten Brustkrebsrisiko für nachfolgende Generationen von Ratten dar, falls während der Schwangerschaft E2 verabreicht wurde [de Assis et al., 2012]. Die Effekte von Estrogenen auf das Pflanzenwachstum, ist im Gegensatz zu Auswirkungen in der Tierwelt geringer. Behandlungen mit E1 und E2 beeinflussten das Wurzel- und Keimwachstum an Kartoffelpflanzen und Sonnenblumensämlingen und führte ferner zur Veränderung der Morphologie- und Blütenmuster [Hamid and Eskicioglu, 2012].

Trotz bewiesener Auswirkungen von Estrogenen bei Tieren, sind gesundheitsschädigenden Effekte auf den menschlichen Organismus noch strittig. Dennoch existieren Studien, die einen Zusammenhang der erhöhten Exposition von endo- und exogenen Estrogenen und deren Effekten diskutieren: i) die Dezimierung der Spermienanzahl [Ahmed, 2000], ii) rückläufige Fortpflanzungsgesundheit beim männlichen Geschlecht [Delbes et al., 2006] und iii) ein Indikator für Brustkrebs [McLachlan et al., 2006]. Systematische Untersuchung der Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit umfasst viele Herausforderungen, beispielsweise Zeitabstände zwischen Exposition und Manifestation der klinischen Störungen, Alter und Dauer der Exposition [Lopez, 2010].

2.5.3 Reinigungsverfahren

Natürliche und synthetische Estrogene (E1, E2 und EE2) sind Stoffe mit endokriner Wirkung, die durchgehend aus der Kläranlage in Oberflächengewässer eingeleitet werden, wodurch endokrinschädliche Auswirkungen auf Wasserorganismen bei niedrigen Konzentrationen ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$) verursacht werden [Kim et al., 2007]. Die organischen Mikroverunreinigungen in der aquatischen Umgebung ist im Wesentlichen durch die ihre Präsenz in den ARA verursacht. Diese Verbindungen neigen zu Biotransformation [Lai et al., 2002] und sind potenziell bioakkumulierend [Gomes et al., 2004], als Folge dieses Verhalten entstehen komplexe Sachverhalte für Umwelt und Gesundheit [Kim et al., 2007]. Mehrere Studien haben die endokrinen Effekte, wie Feminisierung von männlichen Fischen, im Zusammenhang mit diesen estrogen Verbindungen in den ARAs gezeigt [Hamid and Eskicioglu, 2012, Panter et al., 1998, Kidd et al., 2007]. Im großen und ganzen gibt es zwei verschiedene Ansätze zur Entfernung von Estrogenen und andere organischen Mikroverunreinigungen aus Abwasser: i) Optimierung der bestehenden Behandlung Technologie ii) und die Modernisierung bestehender Kläranlagen mit neuen End-of-pipe-Technologie [Koh et al., 2008]. Herkömmliche ARA unterliegen einem dreistufigen Prozess bestehend aus Vorbehandlung, primäre Sedimentation und Zweitbehandlung:

1. Vorbehandlung

- anfängliche Rohwasser Absiedung von großen Objekte, Kies und dichten anorganische Feststoffe
- geringen Mengen organischer Stoffe werden entfernt
- wenig/keine Entfernung von organischen Mikroverunreinigungen und Steroidhormonen [Ternes et al., 1999]

2. primäre Sedimentation

- Entfernung der Mikroverunreinigungen ist von der Hydrophobizität des Hormons, der anschließenden Absiedung des Feststoffanteils und Flächenbelastung abhängig
- Lipophile Verbindungen können absorbiert werden und damit eine große Menge an hydrophoben Verbindungen, einschließlich endokrine Disruptoren
- Estrogene sind polar und besitzen ein geringes Adsorptionsvermögen

3. Zweitbehandlung

- sekundäre biologische Behandlung ist der Schlüsselprozess
- entfernt die meisten Estrogene
- Transformation und Biodegradation übernehmen wichtigsten schritt bei Hormoneliminierung
- Mikroorganismen in biologischen ARAs nutzen Estrogene und Mikroverunreinigungen als Kohlenstoffquelle für den Stoffwechsel

- unter aeroben Bedingungen schnellste und vollständiger Abbau der Schadstoffe

Tropfkörperanlagen

Die Effektivität der Tropfkörper ist geringer als Belebtschlammverfahren bei der Beseitigung von Estrogenen. Weniger als ein Drittel der gesamten Estrogenicity wurde ein Rieseln Filtersystem entfernt [Servos et al., 2005]. Erhöhte Konzentrationen von E1, E2 und EE2 wurden in Abwässern aus Tropfkörperanlagen, über zwei Stichproben Perioden gefunden [Ternes et al., 1999]. Estrogene, insbesondere synthetische Verbindungen, sind stabil genug, um die Prozesse der ARA zu passieren. Umfangreichere Abwasserbehandlungen mit zweiphasigen Tropfkörperanlagen sowie zweiphasigen Sedimentation, konnten für E1 und E2 eine Entfernung von 58 %, die vergleichbar mit Filterleistung von Belebtschlammverfahren (82 %) erzielen [Jiang et al., 2005].

Belebtschlammverfahren

Konventionelle Belebtschlammverfahren werden häufig im privaten und industrielle Maßstab verwendet, um hauptsächlich organische Verbindungen aus Abwässer zu entfernen. Die Entfernung von E1 variiert, jedoch konnten mehr als 85 % der Estrogene E2, E3 und EE2 Entfernt [Mohagheghian et al., 2014]. E1 und E2 werden unter aeroben Bedingungen im Schlamm von ARA abgebaut. EE2 ist unter gleichen Bedingungen persistent. Die Feststoffverweilzeit ist ein entscheidender Faktor bei der Entfernung von Hormonen. Dabei wurde eine Verweilzeit von mindestens 10 und 12,5 Tagen empfohlen. In diesem Zeitintervall wachsen die Mikroorganismen, die die Degradation von E2 und E1 durchführen [Koh et al., 2008]. Jedoch ist die große Menge an überschüssigen Schlamm, der täglich produziert wird, ein erheblicher Nachteil. Die herkömmlichen Methoden zur Schlammbehandlung und Entsorgung (z.B. Deponie und Kompost) ist wegen der strengen Vorschriften sowie sozialen Aspekten, für die Umwelt ein zunehmende Herausforderung [Qiang et al., 2013].

Membran-Bioreaktoren (MBR)

Diese Art von ARA sind wirksam bei der Beseitigung von organischen und anorganischen Verbindungen sowie biologischen Verunreinigungen aus Abwässern [Cicek et al., 1998]. MBR mit Nitrifikation und Denitrifikation bei einer Feststoffverweilzeit von 12 bis 25 Tagen wurden 90 % der Steroide entfernt. Schlamm aus einer MBR (>30 Tage) zeigte deutlich zwei bis drei Mal höhere Mikroorganismen Aktivität, als in konventionellen Belebtschlammverfahren mit einem Feststoffverweilzeit von 11 Tagen [Zeng et al., 2013].

Ozonisierung

Ozon (O_3) reagiert mit organischen Verbindungen über einen direkten Pfad durch molekulares Ozon und einen radikalen Pfad mittels Hydroxyl-Radikal (OH-Radikal). Unter sauren Bedingungen und in Gegenwart von Radikalfängern, die die Reaktionskette hemmen, welche den Abbau von O_3 beschleunigt, dominiert der direkte Pfad der Ozonisierung. Unter basischen Milieu oder in Präsenz gelöster Substanzen, die die Reaktionskette begünstigt, welche die Transformation von O_3 in $\cdot OH$ Radikale beschleunigt, dominiert der Pfad mittels Hydroxyl-Radikal [Hoigné and Bader, 1983]. Wenn das Medium basisch ist, zersetzt sich O_3 zu Hydroxyl-Radikalen, welche ein nicht-selektives und hoch reaktives Oxidationsmittel abgibt und für die Degradation von toxischen organischen Verbindungen in Abwasser verwendet wird [Irmak et al., 2005]. Die Oxidation von E2 durch O_3 wurde bei verschiedenen Dosierungen untersucht.

Ozonisierung ist eine Effektive Methode um E2 und EE2 aus wässriger Lösung abzubauen. Die Abbaurate von E2 ist dabei höher als von EE2. Estrogene werden nicht von Sauerstoff (O_2) oxidiert. Mittels O_3 im basischen Milieu (pH 11) wird eine Entfernungsrat 98 % für E2 und 96 % für EE2 erreicht. Im sauren Milieu (pH 3) wird eine Entfernungsrat 100 % für E2 und 99,7 % für EE2 erreicht [Maniero et al., 2008].

Aktivkohle (AK)

Aktivkohle dient allgemein zur Wasser-und Abwasserbehandlung. Nach den Forschungen über die Adsorptionsfähigkeit endokrin wirksamen Substanzen auf AK wird vermutet, dass eine hohe Adsorptionsfähigkeit bei E1 und E2 besteht [Fukuhara et al., 2006]. Bei der Entfernung mittels AK muss geprüft werden, wie die Adsorptions Eigenschaften zu den physikalischen Eigenschaften des AK korreliert. Weiterhin müssen die Auswirkungen der Stoffe, die im Wasser präsent sind, evaluiert werden und die ob diese auf die Adsorptionsfähigkeit der Estrogene einwirken. Mikroverunreinigungen in kommunalen ARAs sind in der Lage die Adsorptionsfähigkeit der AK zu beeinflussen [?]. Die adsorbierte Menge von E2 in Flusswasser und in kommunalen ARAs reduziert sich auf ein tausendstel, da E2 mit den in Wasser präsenten Substanzen konkurriert [Fukuhara et al., 2006]. Die adsorbierte Menge waren im Bereich von 25,6 bis 73,5 $mg \cdot g^{-1}$ für E1 und 21,3 bis 67,6 $mg \cdot g^{-1}$ für E2 1 $\mu g \cdot l^{-1}$ in reinem Wasser. Die Adsorptionsfähigkeit von E1 ist 8 % höher als bei E2, da E2 hydrophiler als E1 ist [Fukuhara et al., 2006].

Weiter Verfahren zur möglichen Abreinigung

Neuartige Membranen wurden mit Antikörpern versehen die kovalenten am Material gebundenen sind [Urmenyi et al., 2005]. Außerdem konnte eine E2 Dekontamination in Zweiphasenbioreaktoren erzielt werden [Ouellette et al., 2013]. Eine photokatalytische Dekontamination von E2 konnte auch in wässrigen Medium vermittelte mit Titandioxid

(TiO₂) erreicht werden [Mai et al., 2008].

2.5.4 Aptamer

Aptamere sind kurze einzelsträngige Oligonukleotide von 12-80 Basen Länge [Lüllmann et al., 2009]. Die Oligonukleotide können aus reiner einzelsträngiger DNA (ssDNA) oder aus RNA-Molekülen und aus ein Analogon dieser Nukleinsäuren, wie beispielsweise PNA, bestehen [Nielsen, 2009, Ura et al., 2009]. Aptamere falten sich *in vivo* in eine komplexe dreidimensionale (3D) Struktur [Lüllmann et al., 2009]. Diese Strukturen setzen sich aus helikalen und verschiedenen Arten von Schleifen (engl. loops) wie Haarnadeln (engl. hairpins), inneren Schleifen (engl. inner loops) und Verknüpfungen zusammen, welche die Verzweigung der Struktur ermöglichen. Durch die ausgebildete Struktur ist das Aptamer in der Lage, Liganden spezifisch zu binden [Beier et al., 2014]. Die Bindung des Zielmoleküls, durch das Aptamer, wird über den Induced-Fit Bindungsmechanismus ausgelöst, der erstmals durch KOSHLAND im Jahr 1958 publiziert wurde [Koshland, 1958]. Der Induced-Fit-Prozess einigt die Ligand-Bindung am Aptamer und die darauf folgende konformationelle Änderung des Aptamer oder die Konformationsänderung des gebundenen Liganden [Lin et al., 2012]. Neben dem Induced-Fit existieren jedoch noch weitere Bindungsprozesse die in der Literatur diskutiert werden [Bosshard, 2001, Csermely et al., 2010, Changeux and Edelstein, 2011]. Die Anbindung des Liganden an das Aptamer erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen, Stacking-Interactions sowie elektrostatische Wechselwirkungen [Dieckmann et al., 1996, Hermann and Patel, 2000]. Bei den Stacking-Interactions, auch als π - π stacking bezeichnet, handelt es sich bei aromatischen Ringstrukturen um Stapelkräfte durch Elektronenwechselwirkung mit benachbarten Basen [McGaughey et al., 1998]. Unter elektrostatischen Wechselwirkungen werden die Ionen-Dipol- und die Dipol-Dipol-Wechselwirkung (Van-der-Waals-Bindung) zusammengefasst.

Aptamere stellen eine viel versprechende Alternative zu Antikörpern dar, bezüglich ihrer Fähigkeit, bioaktive Moleküle zu detektieren, zu binden und zu beeinflussen. Aptamer sind gegenüber Antikörper, chemisch synthetisierte kleine Moleküle, schneller herzustellen, Kostengünstig und weniger immunogen. Sie sind gleichermaßen für Detektion oder Inaktivierung von Zielmolekülen einsetzbar [Lüllmann et al., 2009]. Die kurzen, einzelsträngigen Oligonukleotide sind in der Lage, hochspezifisch an eine Vielzahl von möglichen Zielmolekülen zu binden [Beier et al., 2014].

Die spezifischen Aptamere werden mittels *in vitro* Selektionsverfahren, der so genannten SELEX-Technologie (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) isoliert [Tuerk and Gold, 1990, Ellington and Szostak, 1990]. Diese Methode basiert auf dem Prinzip der selektiven Erkennung von Zielstrukturen, vermittelt durch die 3D Form der einzelsträngigen Nukleinsäuren. Die Grundlage für diesen Prozess bildet eine kombinatorische randomisierte Molekülbibliothek mit mehr als 10¹⁵ synthetisierten

einzelsträngigen Nukleinsäuresequenzen [Gu and Kim, 2014]. Im Molekülpool können RNA-, ssDNA, oder modifizierte Oligonukleotide (PNA) enthalten sein. Damit für jedes Zieltarget ein Aptamer selektiert werden kann, werden die randomisierten Oligonukleotide einem Selektionsprozess, in Anwesenheit der Zieltargets, unterzogen. Daraus ergibt sich die Separierung in funktionelle und nicht funktionelle Oligonukleotid-Sequenzen. Aptamere, die eine Bindung mit dem Zielmolekül eingegangen sind, werden amplifiziert und in den iterativen Zyklus integriert. Die Runden werden mehrmals durchlaufen, bis die spezifischen Sequenzen mit den höchsten Affinitäten zum Zieltarget bekannt sind [Klug and Famulok, 1994].

Die Einsatzgebiete der Aptamere sind vielseitig. Aptamere besitzen eine hohe Affinität und Spezifität für verschiedene molekulare Targets, wie kleine Moleküle, Proteine, Nukleinsäuren, sogar Zellen und Organismen [Huy et al., 2011]. Speziell ssDNA und RNA Aptamer binden organische Liganden (Theophyllin, Dopamin [Jenison et al., 1994, Strehlitz et al., 2012]), Aminosäuren (Arginin, Valin [Famulok, 1999, Strehlitz et al., 2012]), biologische Kopffaktoren (AMP, NAD [Lin and Patei, 1997, Lauhon and Szostak, 1995]), Antibiotika (Streptomycin, Tetracycline [Wallace and Schroeder, 1998, Strehlitz et al., 2012]), Hormone (Thyreotropin, E2 [Lin et al., 1996, Kim et al., 2007]) und Weichmacher (Bisphenol A [Kim, 2013]). Auf Grund der geringen Größe, der chemischen Stabilität und dem niedrigen Kostenaufwand der Aptamere, bieten sie sich im Einsatz bei Biosensoren (Aptasensors) und Bioassay Methoden an [Song et al., 2008]. Weitere Anwendungen finden sich auf den Gebieten molekularer Diagnostik [Lee et al., 2010].

Anti-E2-Aptamer

Das ssDNA Aptamer gegen E2 wurde aus einer randomisierten ssDNA Bibliothek, welche ca. $7,2 \times 10^{14}$ DNA Moleküle beinhaltet, durch das SELEX Verfahren isoliert. Für diese Auswahl wurden insgesamt sieben Zyklen, mit wiederholter Anreicherung durch Enzyme, durchgeführt. Daraus wurde zehn Aptamere in Bezug auf ihre Affinität zu E2, basierend auf der Gleichgewichtsfiltration, analysiert. Das Intervall der Dissoziationskonstanten, der 10 Aptamere, wurde im Bereich von 0,1 bis 3 μM detektiert. Der folgende ssDNA Strang, mit einer Dissoziationskonstante von 0,13 μM , wurde als ssDNA Aptamer selektiert: 5'-Biotin-GCTTCCAGCTTATTGAATTACACGCAGAGGGTAGCGGCTCTGCGCATTCAATTGCTGCGCGCTGAAGCGCGGAAGC-3'. Es ist ein 76-mer (16 x A, 20 x C, 17 x T und 23 x G) mit einer Masse von 23 kDa [Kim et al., 2007]. Dies Aptamer wurde bereits bei der Entwicklung einer neuartigen Separations- und Anreicherungs-methode von E2, unter Verwendung von Microbeads, angewandt. In Abbildung 2.6 ist der methodische Aufbau visualisiert.

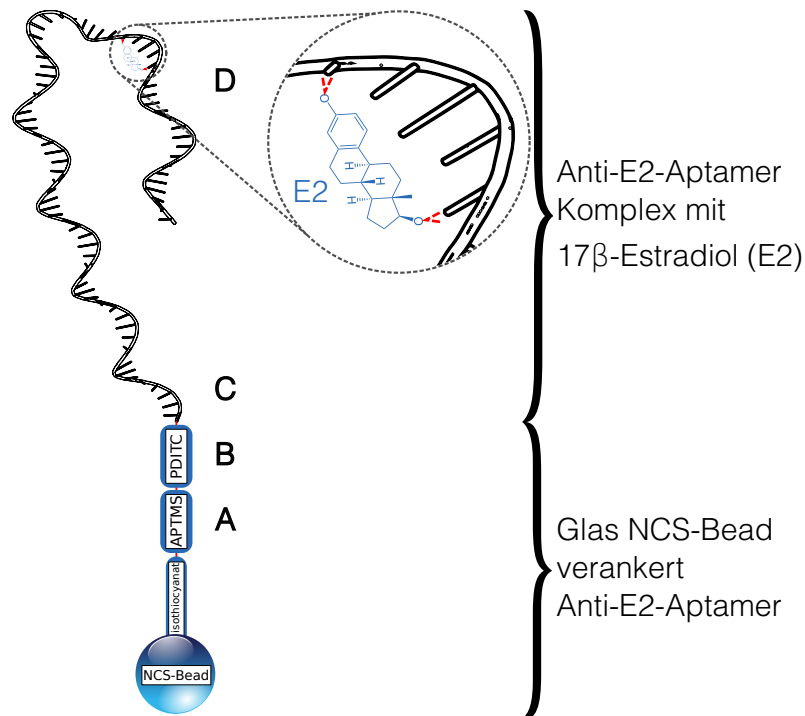


Abbildung 2.6: Schematischer Aufbau der kovalenten Verankerung des Anti-E2 Aptamer am isothiocyanat-Modifizierten Glas NCS-Bead (native calcium sulfat). Durch Modifizierungsschritte wurde der NCS-Bead (i) erst mit (3-aminopropyl)-trimethoxysilane (APTMS) behandelt und (ii) mit p-Phenylene diisothiocyanate (PDITC) inkubiert. (iii) Das Anti-E2 Aptamer wird auf die Oberfläche des behandelten NCS-Bead immobilisiert. (iv) Das Aptamer erfasst E2 selektiv und richtet dieses ab [Huy et al., 2011].

2.5.5 Peptid-Nukleinsäure

PNAs sind künstliche DNAs mit einem ungeladenen pseudopeptid Rückgrat. Im Jahr 1991 wurde das erste Mal die PNA durch NIELSEN ET AL. beschrieben [Nielsen et al., 1991]. Das Zuckerphosphat-Rückgrat ist vollständig durch das Polyamid-Rückgrat ersetzt. Das Rückgrat der PNA besteht aus 2-(Aminoethyl)glycin Einheiten, die Nukleobasen (Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T), Uracil (U)) sind über eine Ethenon mit dem Rückgrat gebunden [Nielsen et al., 1991]. Bereits 1987 wurde durch WESTHEIMER vorgeschlagen, 2-(Aminoethyl)glycin als alternative zum Zuckerphosphat-Rückgrat einzusetzen [Westheimer, 1987]. Die ursprüngliche Idee der PNA, war die Triplex-Strukturausbildung mit doppelsträngiger DNA (dsDNA) [Nielsen et al., 1991]. Neben den Watson-Crick-Paarungen können Basen an der Außenseite der Doppelhelix durch Wasserstoffbrücken binden. Diese Basenpaarungen werden als Hoogsteen-Basenpaarung bezeichnet und sind ebenfalls spezifische [Hoogsteen, 1963]. Ein weiterer dsDNA kann innerhalb der großen Furche einer DNA-Doppelhelix binden. Dadurch entsteht die DNA-Triplex-Struktur (H-DNA). Besonders stabile Bindungen resultieren durch ein G, gebunden an ein GC-Paar (G·G-C Triplex) sowie durch ein T, gebunden an ein AT-Paar (T·A-T Triplex) [Munk, 2010]. PNA Oligomere können sehr stabile duplex Strukturen mit

komplementären DNA, RNA (oder PNA) Oligomeren ausbilden (Watson-Crick Basenpaarung). Pyrimidinreiche PNAs bevorzugen die Ausbildung der starren Tripelhelix der Form PNA-DNA-PNA [Demidov et al., 1995].

Die PNAs werden als molekulare Werkzeuge für Grundlagenforschung in Biologie, Biotechnologie und molekular-technische Verfahren sowie therapeutische und diagnostische Reagenzien zur Behandlung und Erkennung von Erbkrankheiten eingesetzt [Ray and Norden, 2000, Nielsen and Appella, 2013]. PNA eignet sich auf Grund ihrer starken Bindungsaffinität, Sequenz-Selektivität zu DNA/RNA und wegen ihrer Resistenz gegen die Degradation von Proteasen und Nukleasen [Demidov et al., 1994]. Weiterhin durch einfache Synthese über Fmoc(Fluorenylmethoxycarbonyl) Vermittelte Synthese [Thomson et al., 1995] und durch hohe thermische Stabilitäten [Sosniak et al., 2009]. Das ladungsneutrale Rückgrat bringt viele Vorteile mit sich, führt jedoch auch zur mäßigen Wasserlöslichkeit [Braasch and Corey, 2001]. In Verfahren die *in vitro* durchgeführt werden, ist die geringe Wasserlöslichkeit unproblematisch. Anwendungen die hohen PNA Konzentrationen benötigen, ist diese Eigenschaft hinderlich und Handhabung erschwert. Bei der Entwicklung von Microarrays und Oberfläche gebundene Anwendungen, stellte sich heraus, dass PNAs sich anhäufen und auf der Oberfläche kollabieren, wodurch schwache und unspezifische Bindung zustande kommen [Masuko, 2003, Cattani-Scholz et al., 2009].

3 Methoden

3.1 Bindungscharakter von 17 β -Estradiol (E2)

Aus der Studie von KIM ET AL. ist ein ssDNA Aptamer bekannt, das in der Lage ist E2 zu binden, diese wurde als Anti-E2-Aptamer beschrieben [Kim et al., 2007]. Die Bindungsstelle ist bisher unbekannt. Die Lokalisierung der ausgebildeten Bindungsstelle von E2 und dem Anti-E2-Aptamer soll mittels MD *in silico* simuliert und detektiert werden. Dabei gilt es herauszufinden welche Bindungstypen das organische Molekül E2 und das ssDNA Aptamer ausbilden können.

E2 ist ein endogenes Steroidhormon und wird durch den Körper über Enzyme transportiert und beeinflusst mittels intrazellulären Rezeptoren die Genexpression [Yin et al., 2002]. Folglich binden diese Proteine in ihren aktiven Zentren den E2 Liganden. Diese Bindungen werden als Vorbetrachtung genutzt, um Rückschlüsse auf möglichen Bindungsarten des E2 Moleküls gegenüber des ssDNA Aptamers zu ziehen. In der Protein-Datenbank¹ [Bernstein et al., 1977] (engl. Protein Data Bank, abk. PDB) existieren 28 strukturell aufgelöste Proteine, die den E2-Liganden binden (siehe Tabelle A.1, Anhang A.1, Seite 51). Das auf der PDB integrierte Software-Tool PoseView² erstellt automatisiert zweidimensionale (2D) Diagramme des Ligand-Zielstruktur Komplexes, mit bekannten 3D-Strukturen, nach chemischen Zeichnungs Konventionen [Stierand et al., 2006]. Anhand dieser Diagramme kann eine Detektierung der ausgebildeten Ligand-Protein-Komplexe vorgenommen werden. E2 ist in der Lage, vier unterschiedliche Bindungstypen auszubilden, die für die Fixierung in Proteinen beim Transport durch die Blutbahn und in der Zelle verantwortlich sind. Zu diesen zählen Wasserstoffbrückenbindungen, π - π -Stapel (Stacking Interactions) und π -Kation-Interaktionen sowie hydrophobe Wechselwirkungen. Im Anhang A.2 auf Seite 53 sind die PoseView Diagramme der 28 E2 bindenden Proteinstrukturen in den Abbildungen A.1, A.2, A.3, A.4, A.5 und A.6 aufgeführt.

3.2 Sekundärstrukturelemente des Anti-E2-Aptamers

Die Faltung der Sekundärstruktur ist abhängig von der Abfolge der Oligonukleotide und verleiht dem Aptamer die Fähigkeit spezifische Bindungen mit dem Liganden auszubilden. Die Sekundärstrukturelemente wurden mit der Software Mfold³ (Version 3.6) vorhergesagt [Zuker, 2003]. Die vorgeschlagenen Sekundärstrukturen wurden mit den Ergebnissen aus der Studie von KIM ET AL. verglichen und diskutiert. Ferner dienen

¹ <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

² <http://poseview.zbh.uni-hamburg.de/>

³ <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>

die Vorsagen als Grundlage für vorgenommene Verkürzung des Anti-E2-Aptamers, damit die Bindungsmotive identifiziert werden können. Kürzungen wurden im Bereich der Schleifen-Regionen vorgenommen, in ein 3D Struktur mit Modellierungsverfahren generiert und eine molekulardynamische Simulation durchgeführt. *Mfold* erzeugt Sekundärstrukturen in Abhängigkeit der Basenpaarungen und der minimalen freien Faltungsenergie ΔG . Die minimale Faltungsenergie der vorhergesagten Sekundärstrukturen wird errechnet sowie in aufsteigender Reihenfolge dem Nutzer zur Verfügung gestellt. Die Software bietet noch zahlreiche Parametrisierungen für die Vorhersagen an [Zuker, 2003]. Der Parameter *Window* wurde entsprechend der Sequenzlänge gewählt und auf 2 gesetzt, dieser Wert entspricht einem Längenintervall von 50 bis 119 Oligonukleotide. Der *Window*-Parameter steuert, wie viele Faltungen automatisch berechnet werden und wie verschieden sie von einander sein werden. Ein kleinerer Wert führt zu mehr berechneten Faltungen, die einander ähnlich sein können. Ein größerer Wert führt zu weniger Faltungen, die sich gegenseitig sehr unterscheiden [Zuker, 2003]. Alle weiteren Parameter wurden auf den vorgegebenen Einstellungen belassen.

3.2.1 Sekundärstrukturelemente der Substrukturen des Anti-E2-Aptamers

Bezugnehmend auf die durch *Mfold* vorhergesagte Sekundärstrukturen des Anti-E2-Aptamers, wurde die Sequenz verkürzt. Damit die Bindungsstelle des Anti-E2-Aptamers mit verkürztem Zeitaufwand detektiert werden kann, wurden die Schleifen inklusive Stapelregionen verkürzt, mit *Mfold* die Sekundärstrukturen der Substrukturen vorhergesagt und die 3D Struktur durch MD Simulation berechnet. Die Verkürzungen wurden die Schleifen extrahiert, die in allen drei vorhergesagten Sekundärstrukturen A, B und C (siehe Kapitel 4.2) enthalten waren. Zunächst wurden lediglich zwei Schleifen extrahiert (siehe Abbildung 3.1).

Durch die Verkürzung konnten zwei Subsequenzen des Anti-E2-Aptamers extrahiert werden. Die Subsequenzen AE2A-S1 hat die Basenabfolge: 5'-CACGCAGAGGGTAGC GGCTCTGCGCA-3' (5 x A, 8 x C, 3 x T und 10 x G) und die zweite AE2A-S2: 5'-GCGCGCTGAAGCGCGG-3' (2 x A, 5 x C, 1 x T und 8 x G). Die Sekundärstrukturen wurden mit der Software *Mfold*, unter Verwendung des *Window*-Parameter 0, vorhergesagt.

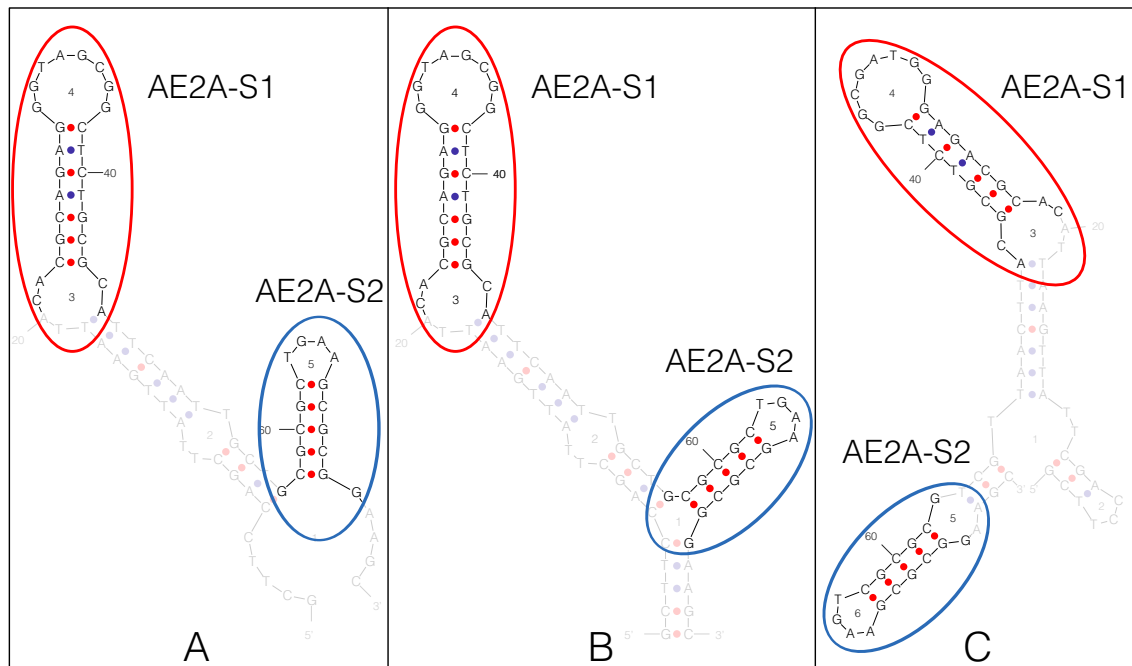


Abbildung 3.1: Bildung der gemeinsamen Substruktur der vorhergesagten Anti-E2-Aptamer Sekundärstrukturen (A), (B) und (C). Die rot umrahmten Sekundärstrukturelemente (Stapelregion und Haarnadelschleife) bilden die erste Substruktur (AE2A-S1), die blau umrahmten die zweite Substruktur (AE2A-S2).

3.3 Molekulardynamische Simulation des Anti-E2-Aptamers

Die ssDNA Sequenz (Kapitel 2.5.4, Seite 23) wurde in eine 3D Struktur sowie in ein übliches PDB-Format überführt, damit die molekulardynamische Simulation durchgeführt werden konnte. Dazu wurden das AMBER⁴ NAB Tool angewandt [Case et al., 2012]. Dieses erstellt aus der 5'-3' Sequenz eine reguläre rechtsgängige doppelsträngige Watson-Crick B-DNA Helix Struktur. Die doppelsträngige DNA wurde durch die Entfernung des 3'-5' Komplementärstrangs in eine ssDNA umgewandelt. Anschließend wurden mit dem GROMACS⁵ pdb2gmx Tool eine Topologie für die ssDNA, unter Verwendung des tip3p (Dreipunkt-Modell) Wassermolekels und unter Verwendung des AMBER96 Kraftfelds, erzeugt [Pronk et al., 2013]. Um die Topologie wurde eine periodische Abgrenzung angelegt. Damit wurden die Randeffekte im endlichen System minimiert. Die Atome des Systems wurden mit einer raumfüllenden Box umschlossen, die von übersetzten Kopien von sich umgeben ist und in der die Simulation durchgeführt wurde. Auf diese Art gibt es keine Grenzen des Systems, welches Artefakte, verursacht durch unerwünschte Grenzen einer isolierten Gruppierung, verursachen könnten. Dies wurden durch periodischen Bedingungen ersetzt. Für die Abgrenzung wurde mit dem GROMACS editconf Tool eine kubische Box generiert. Die Größe der Box wurde so gewählt,

⁴ <http://ambermd.org/>

⁵ <http://www.gromacs.org/>

dass die Distanz von ihrer Begrenzung bis zum Molekül ca. 4.0 nm beträgt. Danach wurde mit GROMACS `genbox Tool` die Box mit Wassermolekülen gefüllt, um die Simulation in Wasser durchzuführen. Dazu wurde das Ein-Punkt-Ladung (engl. Single Point Charge, akt. SPC) Wassermolekülmodell angewandt. Zum Ladungsausgleich des negativ geladenen ssDNA Rückgrats wurden Natriumionen, in gleicher Anzahl wie die vorkommenden Phosphatreste, hinzugefügt. Dazu wurde das GROMACS `grompp Tool` zu Energieminimierung und das GROMACS `genion Tool` zu Ionen Ergänzung angewandt. Anschließend wurde eine weitere Energieminimierung mit dem GROMACS `grompp Tool` durchgeführt. Nachfolgend werden alle durchgeführten Schritte inklusive Kommandozeilenaufrufe aufgelistet:

1. Die Sequenz wurde in 5'-3' Richtung als Start-Struktur in das *.nab File eingetragen. Die reguläre rechtsgängige doppelsträngige Watson-Crick B-DNA Helix Struktur (abdna) wurde gewählt und das PDB Format als Ausgabeformat festlegen.

```
1 molecule m;  
2  
3 m = fd_helix( "abdna", "  
    GCTTCCAGCTTATTGAATTACACGCAGAGGGTAGCGGC  
    TCTGCGCATTCAATTGCTGCGCGCTGAAGCGCGGAAGC", "dna" );  
4 putpdb( "nuc.pdb", m, "-wwpdb");
```

2. Das NAB Tool wurde mit dem erzeugten nuc.nab File, zum Erhalt der 3D Struktur, in der Shell ausgeführt.

```
1 nab nuc.nab  
2 ./a.out
```

3. Der 3'-5' Komplementärstrang wurde mit Pymol⁶ aus dem PDB File entfernen.
4. Das erzeugte PDB File wurde mit dem GROMACS `pdb2gmx Tool` in das GROMACS Dateiformat konvertiert (.gro), das Wassermolekülmodell `tip3p` festlegt und das Topologie File erstellt.

```
1 pdb2gmx -f nuc_ssDNA.pdb -o nuc_ssDNA_processed.gro  
    -water tip3p
```

5. Nachfolgende Abfrage ermöglichte die Auswahl der Kraftfelder. Das AMBER96 (Taste 3) wurde gewählt.
6. Mit dem GROMACS `editconf Tool` wurde die Box erzeugt, in der die Simulation abläuft. Es wurde eine kubische Box erstellt (-bt cubic), die Boxgröße gewählt (-d 4.0), und die Zentrierung der ssDNA in der Box angewiesen (-c).

```
1 editconf -f nuc_ssDNA_processed.gro -o  
    nuc_ssDNA_box.gro -c -d 4.0 -bt cubic
```

⁶ <http://www.pymol.org/>

7. Durch das GROMACS `genbox` Tool wurde die Box mit Wassermolekülen gefüllt. Dazu wurde das Wassermolmodell SPC eingesetzt und das Topologie File aus Punkt 4. hinzugefügt (`-p topol.top`).

```
1 genbox -cp nuc_ssDNA_box.gro -cs spc216.gro -o  
nuc_ssDNA_solv.gro -p topol.top
```

8. Anschließend wurde mit GROMACS `grompp` Tool eine Minimierung Energie durchgeführt.

```
1 grompp -f nuc_ions.mdp -c nuc_ssDNA_solv.gro -p  
topol.top -o nuc_ions.tpr
```

9. Mit dem GROMACS `genion` Tool wurden Natriumionen (Na^+) zum minimierten negativ geladenen System hinzugefügt.

```
1 genion -s nuc_ions.tpr -o nuc_ssDNA_solv_ions.pdb -p  
topol.top -pname NA -np 75 -rmin 1.0
```

10. Nachfolgende Abfrage ermöglichte die Auswahl der Molekülgruppen die anstelle der Na^+ Ionen ersetzt werden sollten. Die Gruppe SOL (solvent molecules) (Taste 3) wurde gewählt.

Durch die Modellierungsschritte 1-10 wurde eine Simulationsbox mit dem Aptamer, Lösungsmittel und Ladungsausgleichenden Ionen erstellt. Die MD Simulation, die alle Atome umfasste, wurde mit dem Softwareframework OpenMM⁷ durchgeführt Eastman2013. Diese fungiert auf eine Python basierte Anwenderschnittstelle und Bibliotheken für GROMACS. Das erstellte Skript ist im Anhang A.3 auf Seite 58 vorgelegt. Die Simulation wurde bei konstanter Temperatur sowie Druck (Isotherm-isobares Ensemble) unter 3D periodischen Randbedingungen parallelisiert realisiert. Die Simulationstemperatur wurde durch Langevin Dynamiken bei 300 K und der Druck durch Monte Carlo Barostat Methode bei 1 atm konstant reguliert. Der zur Langevin Dynamik dazugehörige Reibungskoeffizient wurde auf 1 ps^{-1} und die Schrittrate auf 0,001 ps gesetzt. Die möglichen Funktionen bei Faltung und das Aptamer wurden mit AMBER94 Kraftfeld modelliert. Das explizite Lösungsmittel (H_2O) wurde als Dreipunkt-Modell (TIP3) behandelt. Für die Berechnungen der Van-der-Waals-Wechselwirkungen wurde ein maximaler Abstand von 1 nm festgelegt. Die weiträumigen elektrostatischen Wechselwirkungen wurden mit der Particle mesh Ewald (PME) Methode geschätzt. Die angestrebten Schritte der MD Simulation wurden auf 20.000.000 Schritte konfiguriert, welche einer realen Faltungszeit von 20 ns entspricht. Die Trajektorie wurde alle 10.000 Schritte (0,01 ns) ermittelt.

Die molekulardynamische Simulation wurde auf einer Windows Server 2008 R2 Enterprise 64-bit Workstation mit folgenden Leistungskomponenten berechnet:

- 12 x Intel[®] Xeon[®] X5690 CPUs mit jeweils 3,5 GHz

⁷ <https://simtk.org/home/openmm>

- 98.304 MB RAM Arbeitsreicher
- 4 x Nvidia[®] Tesla[®] C2075 Grafikkarte mit jeweils 6.144 MB RAM Arbeitsreicher

3.3.1 Molekulardynamische Simulation des AE2A-S1

Mittels Modellierungsabläufe wurde das identischen Wassermodel sowie Kraftfeld hinzugefügt und eine 3D Struktur mit 25 Na^+ Ionen generiert. In Abbildung 3.2 sind die wesentlichen Schritte des Modellierungsverfahren zusammengetragen.

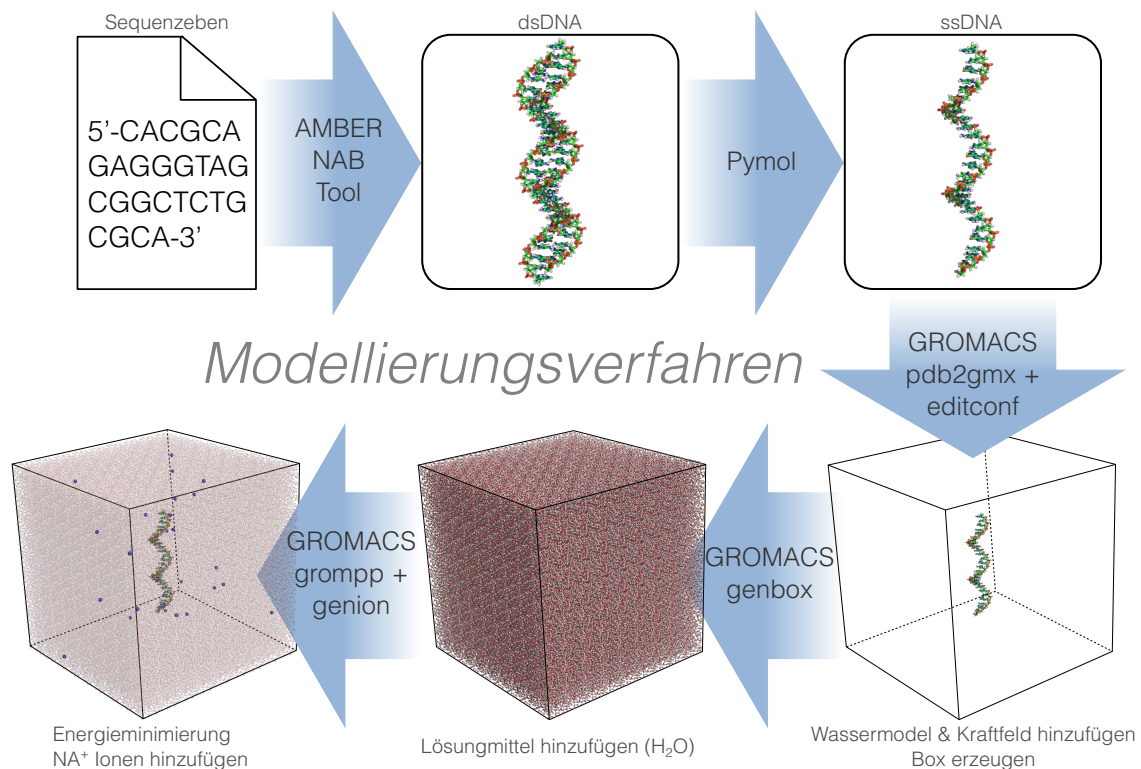


Abbildung 3.2: Schematischer Modellierungsablauf von der Sequenzebene bis zur gelösten und neutralen 3D Struktur.

Die Simulation der Substruktur AE2A-S1 durch OpenMM wurde unter gleichen Bedingungen wie bei der Simulation des Anti-E2-Aptamers durchgeführt (siehe Kapitel 3.3).

3.4 Überführung in ssPNA

Der *in vivo* Einsatz des Anti-E2-Aptamers wird für experimentelle versuche zur Entfernung von E2 zum eingesetzt. In der Wasserumgebung sind Proteine enthalten, die in der Lage sind DNA abzubauen, wie beispielsweise Nukleasen. Die PNA soll diesen Effekten entgegen wirken, denn diese resistent gegen Nukleasen und Proteasen [Demidov et al., 1994]. Daher soll das Anti-E2-Aptamer in die robustere PNA Überführt, mittel MD Simulation die 3D Struktur berechnet und mögliche Bindungsstellen mit E2 identifiziert

werden. Bereits 1998 publizierten die Kollegen SEN UND NILSSON einen theoretischen Ansatz, der beschrieb wie DNA in eine PNA überführt werden kann. Dieser beruhte auf i) den austauschen von Atomen des Rückgrats, ii) die Entfernungen der Atome die nicht in der PNA vorkommenden, iii) die Brechung fehlender Atome und vi) das Hinzufügen von fehlenden Wasserstoffatomen [Sen and Nilsson, 1998]. Die folgenden Austausche waren für die Atome der DNA zur Überführung in PNA vorgesehen, dabei wurde die aktuelle PDB File Annotation für PNA Strukturen eingehalten [Yeh et al., 2010]:

- $O5' \rightarrow N1'$
- $C5' \rightarrow C2'$
- $C4' \rightarrow C3'$
- $C3' \rightarrow N4'$
- $C2' \rightarrow C7'$
- $C1' \rightarrow C8'$
- $O3' \rightarrow C5'$
- $P \rightarrow C'$

Die Atome des DNA Rückgrats OP1, OP2 und O4' sollten entfernt und die Koordinaten für Atome O1' sowie O7' des PNA Rückgrats berechnet werden. Das Atome O1' ist im PNA Rückgrat über eine Doppelbindung an das C' gebunden. Das O7' Atome ist hingegen mit geht mit dem PNA Atom C7' eine Doppelbindung ein. Abbildung 3.3 zeigt die monomere DNA und PNA Einheit als Skelettformel.

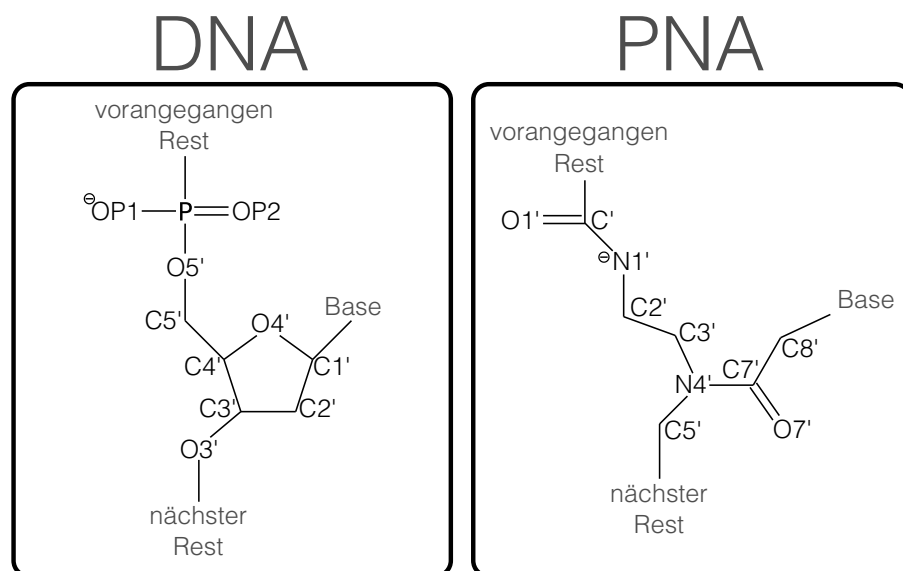


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der chemischen Struktur DNA und PNA als monomere Einheit als Skelettformel.

Die Entfernung sowie Austausche der DNA Atome zur Überführung in PNA und die Berechnung der fehlenden PNA Rückgrat Atome wurde mit der Programmiersprache Java

umgesetzt. Dazu wurde das BioJava Framework eingesetzt [Prlic et al., 2012]. Dieses Framework ermöglicht durch vordefinierte Methoden und Funktionen für 3D Strukturen eine komfortable Handhabung. Der Algorithmus für die automatisierte Überführung von DNA zu PNA wurde in vier Abschnitte eingeteilt: i) die Rekonstruktion der fehlenden Atome O1' und O7', ii) die Entfernung der nicht benötigten Atome, iii) die Austausche der DNA- zu PNA Rückgrat Atome und iv) die Generierung der PNA in das PDB Format. Die Rekonstruktion des PNA O1' Atomes wird durch die Lage der Phosphat-Rest, genauer durch die Koordinaten der drei Atome OP1, P und OP2 bestimmt. Der Phosphat-Rest besitzt eine tetraedrische Molekülgeometrie ist daher nicht planar. Für die Berechnung der O1' Koordinaten wurde jedoch nur drei von fünf Atomen benötigt. Die Koordinaten der drei DNA Atome OP1, P und OP2 wurden in die Vektoren \vec{p}_{OP1} , \vec{p}_P und \vec{p}_{OP2} überführt. Anschließend wurde der Mittelpunktvektor \vec{m}_{OO} , der aus den beiden Vektoren \vec{p}_{OP1} und \vec{p}_{OP2} gebildet wurde, nach der Berechnung $\vec{m}_{OO} = \frac{1}{2} \cdot (\vec{p}_{OP1} + \vec{p}_{OP2})$ ermittelt. Anschließend wurde der \vec{p}_P vom \vec{m}_{OO} subtrahiert $\vec{p}_{mP} = \vec{m}_{OO} - \vec{p}_P$, dieser ist in die Richtung des neu zu erzeugenden Atoms ausgerichtet. Durch anschließende Normalisierung $\left(\frac{\vec{p}_{mP}}{\|\vec{p}_{mP}\|}\right)$ konnte der Vektor durch Skalarmultiplikation um eine Distanz von 1,2 Å verlängert werden $\vec{p}_{O7'} = 1,2 \cdot \vec{p}_{mP}$. Diese Distanz entspricht einer Kohlenstoff Sauerstoff Doppelbindungslänge. Von dem Vektor $\vec{p}_{O7'}$ wurde die Koordinaten extrahiert und ein das Atom O1' generiert. Die Koordinaten des Atoms O7' wurde aus den DNA Atomen C1', C2' und C3', durch die selbige Methodik, bestimmt und generiert. Nach Brechung der fehlenden Atome O1' und O7' wurden die Atome O4', OP1, OP2 sowie die Wasserstoffatome, aus dem DNA Rückgrat eliminiert. Durch den vorletzte Schritt wurden die oben Beschriebenen Austausche durchgeführt. Anschließend wurde das PDB File mit der in PNA umgewandelten 3D Struktur geschrieben. Nach Hinzufügen der Wasserstoff Atome ist das PNA Molekül für die kommende Vorverarbeitungen, im Hinblick auf die MD Simulation, vollständig.

4 Ergebnisse

4.1 Bindungscharakter von 17β -Estradiol

Die Bindungsarten die E2 mit den 28 Proteinen ausbilden kann, wurden Quantitativ erfasst und gegenübergestellt. Abbildung 4.1 zeigt das absolute Auftreten der ausgebildeten Wechselwirkung in den einzelnen Proteinstrukturen.

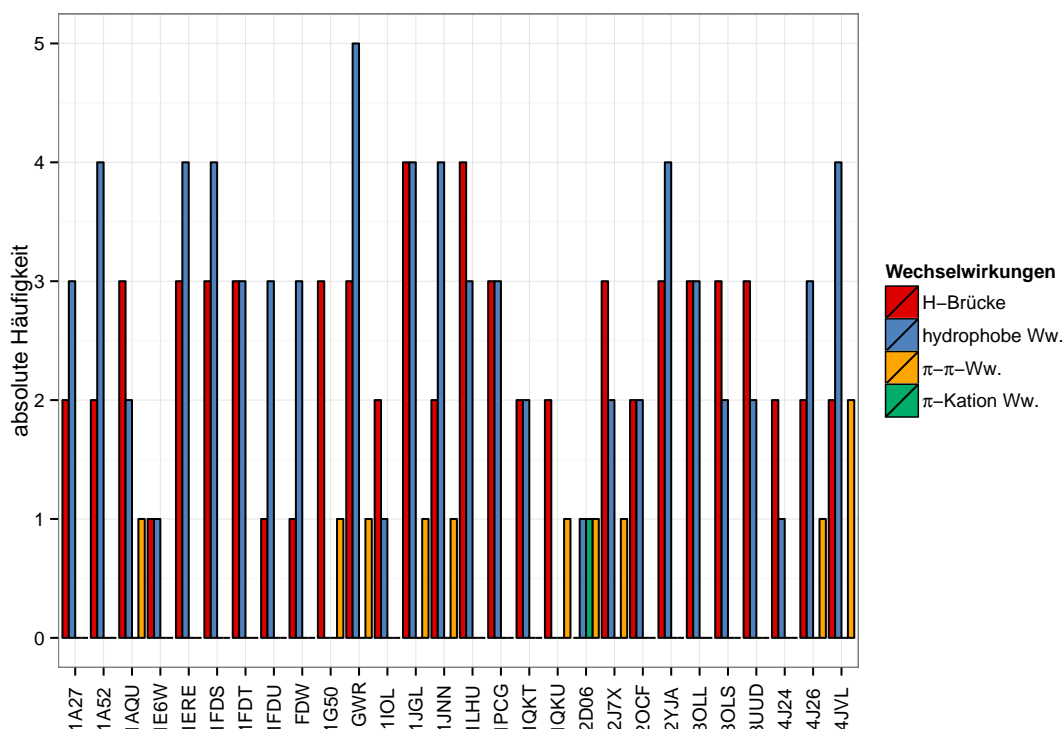


Abbildung 4.1: Quantitativer Überblick über die Wechselwirkungen von 28 bekannten Proteinen mit E2. Die Wechselwirkungen beinhalten ausgebildete Wasserstoffbrückenbindungen (rot), hydrophobe Wechselwirkungen mit unpolaren Aminosäuren (blau), π - π -Interaktionen zwischen zyklischen Verbindungen (orange) sowie π -Kation-Interaktionen zwischen zyklischen Verbindungen und positiv geladenen Aminosäuren (grün).

Wasserstoffbrückenbindungen werden mit Ausnahme von PDB:2D06 in allen Proteinen ausgebildet und dienen als Basis in der Protein-Liganden-Bindung. Hydrophobe Wechselwirkungen kommen in allen Proteinen mit Ausnahme von PDB:1G50 und PDB:1QKU vor und dienen zur strukturellen Anordnung des E2-Moleküls an der Bindungsstelle. Selten bilden sich Stacking-Interaktionen zwischen den aromatischen Ringstrukturen einer Aminosäure und der aromatischen Ringstruktur des E2-Moleküls aus. Des Weiteren existiert eine Protein-E2-Komplexbildung (PDB:2D06), bei der eine π -Kation-Interaktion

zwischen der aromatischen Ringstruktur des E2 und einer positiv geladenen Aminosäure ausgebildet wird.

4.2 Sekundärstrukturelemente des Anti-E2-Aptamers

Drei mögliche Sekundärstrukturen wurden unter Einsatz von Mfold für das Anti-E2-Aptamer vorhergesagt. Die drei vorhergesagten Sekundärstrukturen beinhalten mehrere hilkale Strukturen (stem) sowie Schleifen (loop). Abbildung 4.2 stellt die drei Sekundärstrukturen sowie zugehörige minimalen freien Faltungsenergien gegenüber.

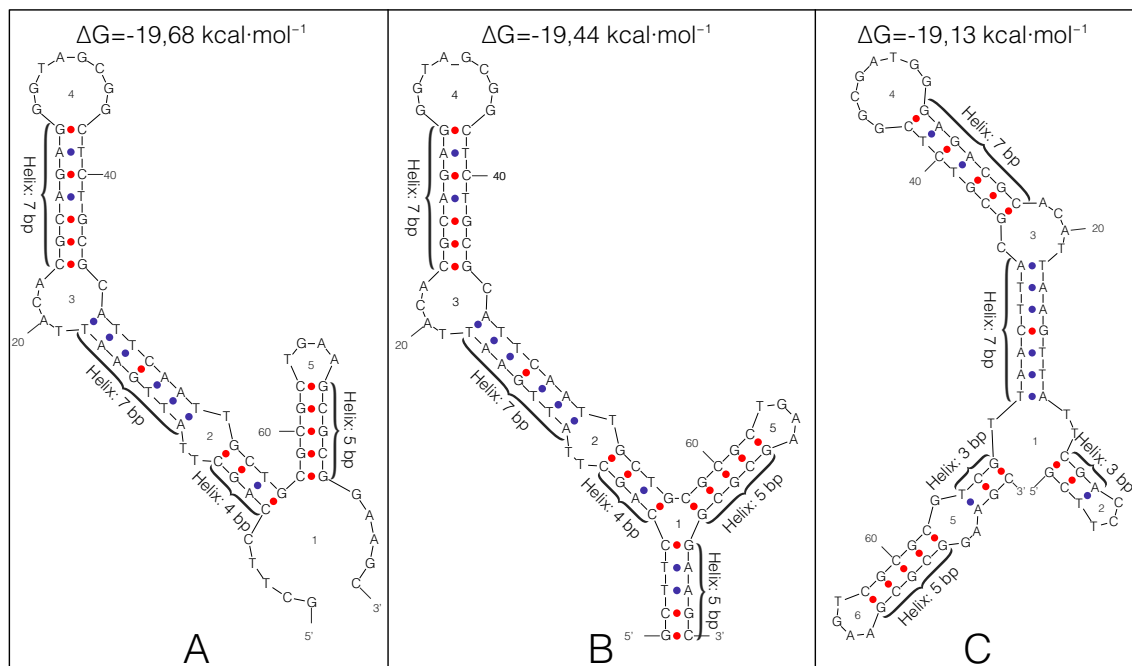


Abbildung 4.2: Sekundärstrukturvorhersagen des Anti-E2-Aptamers durch Mfold lieferte drei Sekundärstrukturen mit voneinander abweichenden minimalen freien Faltungsenergien sowie gekennzeichneten helikalen Strukturen und nummerierten Schleifen: (A) fünf Schleifen, vier Stapelregionen; (B) fünf Schleifen, fünf Stapelregionen; (C) sechs Schleifen, fünf Stapelregionen (bp: Basenpaare).

Struktur (A) bildete zwei Haarnadelschleife (hairpin loop) aus (4 und 5), (1) eine äußere Schleife (exterior loop), zwei innere Schleifen (interior loop) aus (2 und 3) und besitzt vier Stapelregionen (stem region) die helikale Strukturen ausbilden. In (B) wurden ebenfalls zwei Haarnadelschleife vorhergesagt (4 und 5). Es wurde zusätzlich eine innere Schleife (2), (1) eine Verzweigung (multiloop) sowie fünf Stapelregionen vorhergesagt. Sekundärstruktur (C) bildete drei Haarnadelschleife (2, 4 und 6), zwei innere Schleifen (3 und 5) sowie eine externe Schleife (1) aus. Zusätzlich wurden fünf Stapelregionen vorgeschagt. Die detaillierten Thermodynamiken der Faltungsvorhersagen des Anti-E2-Aptamers sind im Anhang B.1 für (A) in Tabelle B.1 auf Seite 60, für (C) in Tabelle B.2 auf Seite 61 und für (C) in Tabelle B.3 auf Seite 62 hinterlegt. In Abbildung 4.3 wurden die drei vorhergesagten Sekundärstrukturen auf überlappenden Stapelregionen geprüft.

Basenpaare die in alle Faltungen auftreten sind schwarz gefärbt. Diejenigen, die in zwei oder mehr, jedoch nicht alle Faltungen auftreten sind grau oder mehrfarbig gefärbt (Parameter *Multicolor Overlap*: false/true). Andernfalls wird Basenpaare eine einzigartige Farbe, die von der Struktur abhängt, zugeteilt [Zuker, 2003].

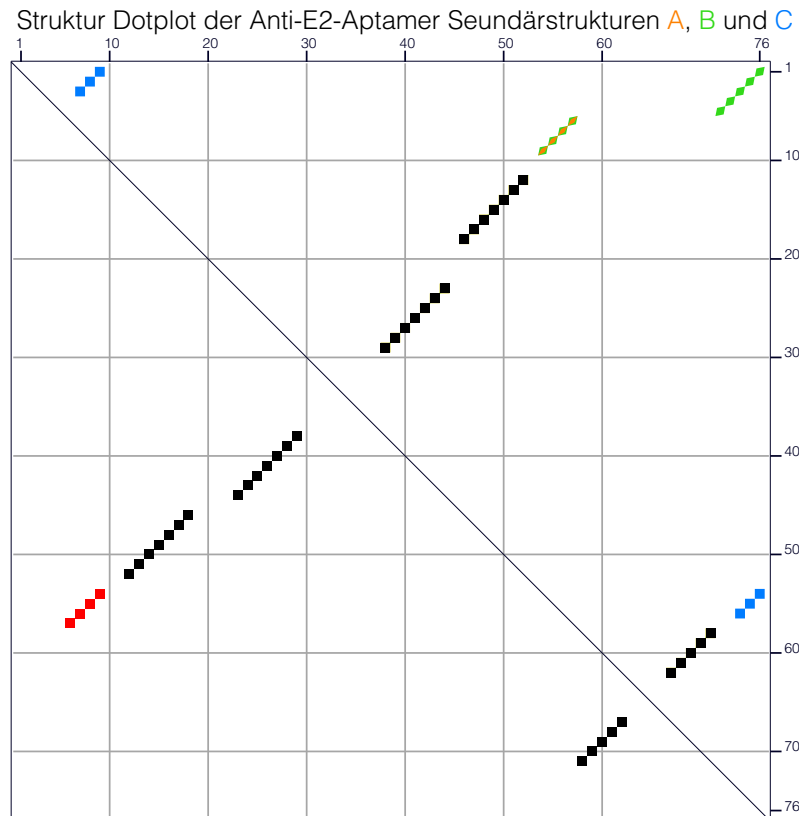


Abbildung 4.3: Struktur Dotplot der vorhergesagten Anti-E2-Aptamer Seundärstrukturen **A** (orange), **B** (grün) und **C** (blau). Das obere Dreieck zeigt die überlappenden und nicht überlappenden Stapelregionen. Die Schwarzen Bereiche zeigen die 19 vorhergesagten Basenparungen die in den drei Strukturen gleichermaßen vorkommen, der orange-grün Punkte zeigt die Überlappung zwischen **A** und **B** (vier Basenpaare) und die grünen und blauen Punkte zeigen die Basenpaare die nur in **B** und nur in **C** vorhergesagt wurden. Das untere Dreieck zeigt ausschließlich die überlappenden Bereiche der Seundärstrukturen **A** und **B**, **A** und **C** sowie **B** und **C**. Dabei werden die gleich vorhergesagten Basenpaare von **A** und **B** als vier rote Punkte gekennzeichnet.

4.2.1 Sekundärstrukturelemente der Substrukturen des Anti-E2-Aptamers

Die Vorhersage der Anti-E2-Aptamer Substrukturen AE2A-S1 und AE2A-S2 durch Mfold brachte jeweils eine Sekundärstruktur hervor. Die ausgebildeten Substrukturen sind in Abbildung 4.4 dargestellt. AE2A-S1 brachte eine Stapelregion mit Haarnadelschleife und sind mit den Bereichen in den Sekundärstrukturen A, B und C des Anti-E2-Aptamers identisch. Die innere Schleife ist aufgelöst und wurde zu zwei einzelsträngi-

gen Regionen vorhergesagt. Die Substruktur AE2A-S2 ist ebenfalls mit den Bereichen der ausgebildeten Stapelregion mit Haarnadelschleife in allen drei Sekundärstrukturen A, B und C des Anti-E2-Aptamers identisch. Die zwei Basen am Anfang der Stapelregion wurden zu zwei einzelsträngigen Regionen vorhergesagt. Diese waren, in der Sekundärstruktur des Anti-E2-Aptamers, Bestandteil einer externen Schleife (A), einer Verzweigung (B) und einer inneren Schleife (C). Die detaillierten Thermodynamiken der Faltungsvorhersagen der Substrukturen AE2A-S1 und AE2A-S2 sind in den Tabellen 4.1 und 4.2 aufgeführt. Diese enthalten die aufgeschlüsselten Faltungen in Schleifen und Stapelregionen mit zugehöriger freien Energie δG und die schließenden Blasenpaare.

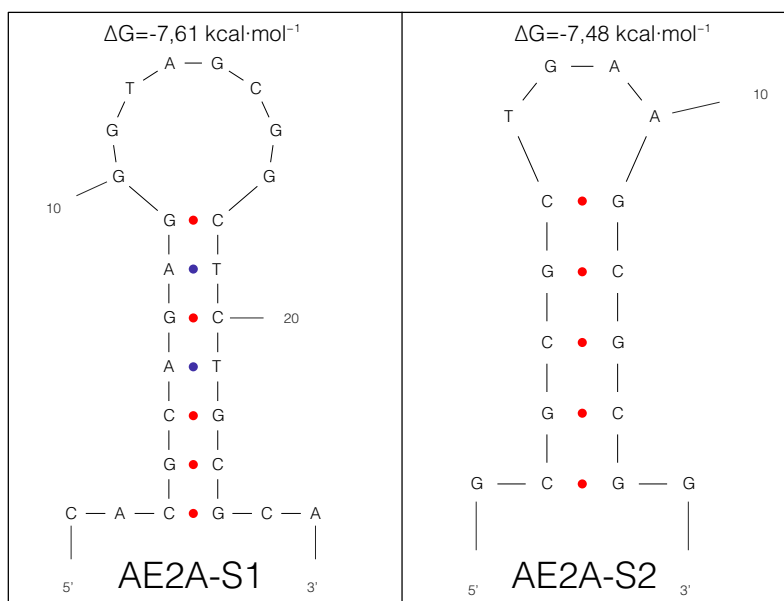


Abbildung 4.4: Sekundärstrukturvorhersagen Substrukturen AE2A-S1 und AE2A-S2 durch Mfold lieferte jeweils eine Sekundärstruktur mit minimalen freien Faltungsenergien. In Substruktur 1 (**AE2A-S1**) wurde eine Haarnadelschleifen und eine Stapelregion und in Substruktur 2 (**AE2A-S2**) wurde eine Haarnadelschleifen und eine Stapelregion vorhergesagt.

4.3 Molekulardynamische Simulation des Anti-E2-Aptamers

Die Schritte des Modellierungsverfahrens, von der Sequenzebene bis zur gelösten und neutralisierten 3D Struktur (Schritte 1-10), ergab eine gesamt Atomanzahl von 3.887.555. Davon waren 3.885.066 Atome (99,936 %) Lösungsmittel (SOL), 75 Atome (0,002 %) für den Ausgleich des negativ geladenen Rückgrats (NA^+ Ionen) und das Anti-E2-Aptamer bestand aus 2.414 Atomen (0,062 %). Das Aptamer hatte eine Länge von ca. 25,69 nm. Die Box in der die Simulation durchgeführt wurde besaß eine Abmessung von ca $33,69 \text{ nm}^3$. Die MD Simulation in dem Softwareframework OpenMM wurden über das Python Skript (siehe Anhang A.3, Seite 58) gestartet. Die Simulation konnte

Tabelle 4.1: Thermodynamik der Mfold Faltungsvorhersage der Anti-E2-Aptamer Subsequenz (**AE2A-S1**) mit minimaler freier Faltungsenergie von $-7.61 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ bei einer Temperatur von 37°C .

Structural element	δG [$\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$]	Information
External loop	-1.19	4 ss bases & 1 closing helices.
Stack	-2.17	External closing pair is C ₃ -G ₂₄
Stack	-2.24	External closing pair is G ₄ -C ₂₃
Stack	-1.45	External closing pair is C ₅ -G ₂₂
Stack	-1.28	External closing pair is A ₆ -T ₂₁
Stack	-1.30	External closing pair is G ₇ -C ₂₀
Stack	-1.28	External closing pair is A ₈ -T ₁₉
Hairpin loop	3.3	Closing pair is G ₉ -C ₁₈
ΔG	-7.61	

Tabelle 4.2: Thermodynamik der Mfold Faltungsvorhersage der Anti-E2-Aptamer Subsequenz (**AE2A-S2**) mit minimaler freier Faltungsenergie von $-7.48 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ bei einer Temperatur von 37°C .

Structural element	δG [$\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$]	Information
External loop	-1.16	2 ss bases & 1 closing helices.
Stack	-2.17	External closing pair is C ₂ -G ₁₅
Stack	-2.24	External closing pair is G ₃ -C ₁₄
Stack	-2.17	External closing pair is C ₄ -G ₁₃
Stack	-2.24	External closing pair is G ₅ -C ₁₂
Hairpin loop	2.5	Closing pair is C ₆ -G ₁₁
ΔG	-7.48	

bei einer Distanzwahl von 4 nm (Abstand von Boxbegrenzung bis zum Molekül) nicht gestartet werden.

4.3.1 Molekulardynamische Simulation des AE2A-S1

Die Prozessierung der Modellierungsverfahren für die Subsequenz AE2A-S1 des Anti-E2-Aptamers ergab eine gesamt Atomanzahl von 498.463 Atome. Das System besitzt 87,18 % weniger Atome als das Anti-E2-Aptamer System mit einer gewählten Distanz von 4 nm. Das System bestand aus 25 NA^+ Atome (0,005 %) für den Ausgleich des negativ geladenen Rückgrats, 497.613 Atome (99,829 %) Lösungsmittel (SOL) und das AE2A-S1 bestand aus 825 Atomen (0,166 %). Diese hatte eine Länge von ca. 8,87 nm. Die Box in der die Simulation durchgeführt wurde hatte eine Größe von ca. $16,87 \text{ nm}^3$. Die MD Simulation der Faltung wurde bis ca. 17,6 ns berechnet. Die gestreben 20 ns konnten nicht erreicht werden. Die Systemtemperatur steigt von Beginn der MD Simulation in wenigen Zeitschritten auf die festgelegt Temperatur von 300 K und erreichte eine maximale Temperatur von 303,2 K. In Abbildung 4.5 ist der Temperaturverlauf über den Zeitraum von 17,6 ns aufgetragen. Die Trajektorie wurde aller 0,01 ns ermittelt und in

ein separates Model, in ein PDB File geschrieben. Insgesamt wurden 1.759 Trajektorien berechnet. Anhand dieser Modelle konnten die Faltungsabläufe zu jedem 10.000 Zeitschritt beobachtet werden. Die Beobachtung der Faltung wurde anhand ausgebildeter Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen A und T sowie G und C. Auf diese Weise konnte eine Ausbildung der vorgeschlagenen Sekundärstruktur (siehe Kapitel 4.2.1) beobachtet werden. Der Fokus lag dabei auf die Stapelregionen die eine Helix ausbilden. Die Distanz der H-Brücken wurde in erster roher Betrachtung für alle fünf möglichen H-Brücken-Distanzen auf 3,5 Å gesetzt. In Abbildung 4.6 ist die absolute Häufigkeit der ausgebildeten H-Brücken bei zugehörigen Zeitschritt abgebildet. Im Zeitschritt 2,49 ns wurde die höchste aufkommen an Wasserstoffbrücken detektiert. Bei diesen fünf H-Brücken handelte es sich um die Watson-Crick Basenpaarung $A_{61} \cdots T_{O4}$ (3,38 Å), $G_{H1} \cdots C_{N3}$ (3,19 Å), $G_{O6} \cdots C_{H41}$ (3,43 Å), $G_{H21} \cdots C_{O2}$ (2,31 Å) und $A_{N1} \cdots T_{H3}$ (3,24 Å). Im gesamten Simulationsverlauf bildeten sich 1841 H-Brücken aus. Bei weiteren Einschränkungen der H-Brücken-Distanz wurde eine maximale Grenze von 2,5 Å gesetzt [Sakamoto et al., 2005]. In Abbildung 4.7 wurde deutlich, dass das maximale aufkommen von H-Brücken auf zwei beschränkt ist. Im gesamten Simulation wurden 165 H-Brücken ausgebildet. Durch weitere Verschärfung der Wasserstoffbrückendistanz nach CÉLIA ET AL. wurden keine Ergebnisse erzielt. Die Distanzen der H-Brücken wurden in der Publikation folgendermaßen beschrieben [Célia et al., 2000]:

- $G_{O6} \cdots C_{H41}$ eine Bindungslänge von 1,67 Å
- $G_{H1} \cdots C_{N3}$ eine Bindungslänge von 1,84 Å
- $G_{H21} \cdots C_{O2}$ eine Bindungslänge von 1,84 Å
- $A_{N1} \cdots T_{H3}$ eine Bindungslänge von 1,74 Å
- $A_{61} \cdots T_{O4}$ eine Bindungslänge von 1,82 Å

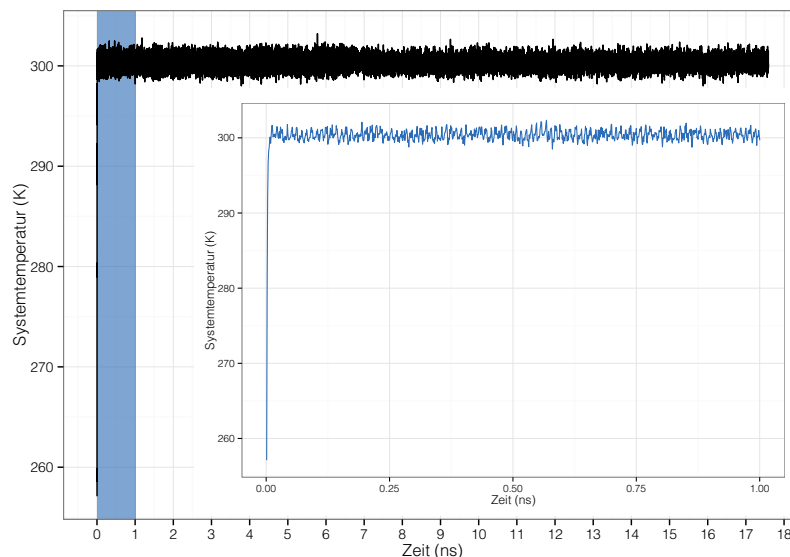


Abbildung 4.5: Systemtemperatur im zeitlichen Verlauf der MD Simulation der AE2A-S1. Der Zeitverlauf unten rechts repräsentiert den blau hervorgehobene Bereich im Hauptdiagramm ab dem Zeitpunkt null bis 1 ns.

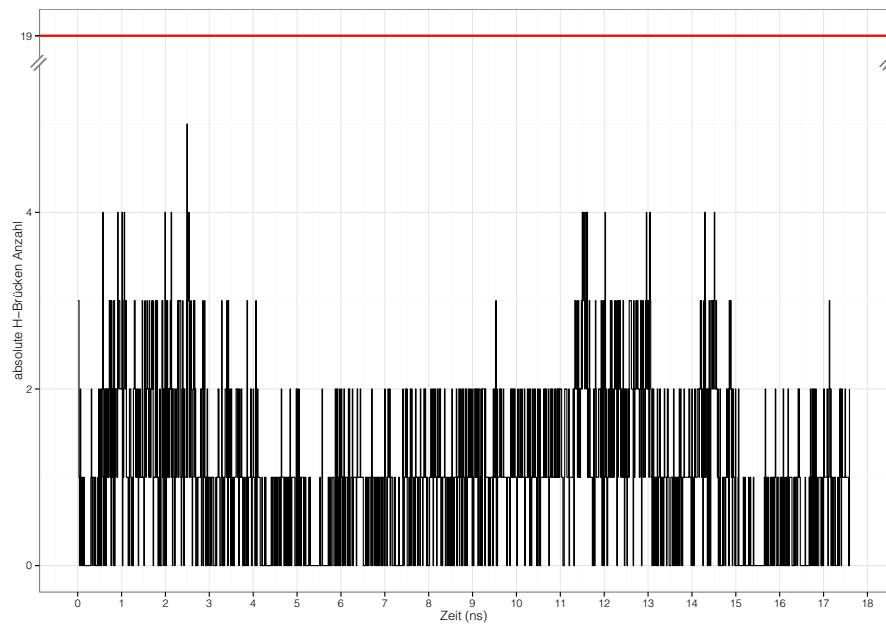


Abbildung 4.6: Absolute Anzahl der auftretenden Wasserstoffbrückenbindungen bei einer Distanz von 3.5 Å, repräsentiert durch die Atome der Basenpaare AT und GC. Die rote horizontale Linie stellt die Grenze, der maximalen Anzahl an möglichen Wasserstoffbrückenbindungen, dar. Bei 2,49 ns sind fünf H-Brücken aufgetreten.

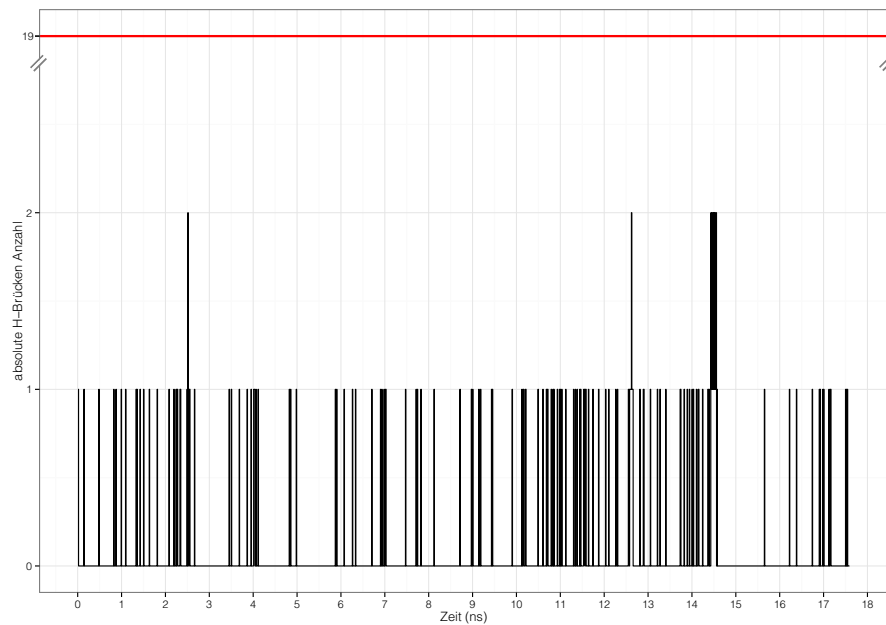


Abbildung 4.7: Absolute Anzahl der auftretenden Wasserstoffbrückenbindungen bei einer Distanz von 2.5 Å, repräsentiert durch die Atome der Basenpaare AT und GC. Die rote horizontale Linie stellt die Grenze, der maximalen Anzahl an möglichen Wasserstoffbrückenbindungen, dar. Zwei H-Brücken wurden in acht unterschiedlichen Zeitschritten ausgebildet.

4.4 Überführung in ssPNA

Der Konverter hat das Anti-E2-Aptamer erfolgreich in ein ssPNA Molekül umgewandelt. Abbildung 4.8 zeigt einen Ausschnitt der Anti-E2-Aptamer ssDNA (links) und die daraus generierte ssPNA (rechts) als 3D Strukturen. Die Überführung konnte durch das Java Programm realisiert werden. Für die Überführung wurde das Anti-E2-Aptamer als grundlegende Struktur verwendet und daraus die ssPNA erzeugt. Die Positionen der Basen A, T, G und C habe sich nicht verändert und die Helix der ssDNA bleibt nach Konvertierung in ssPNA erhalten.

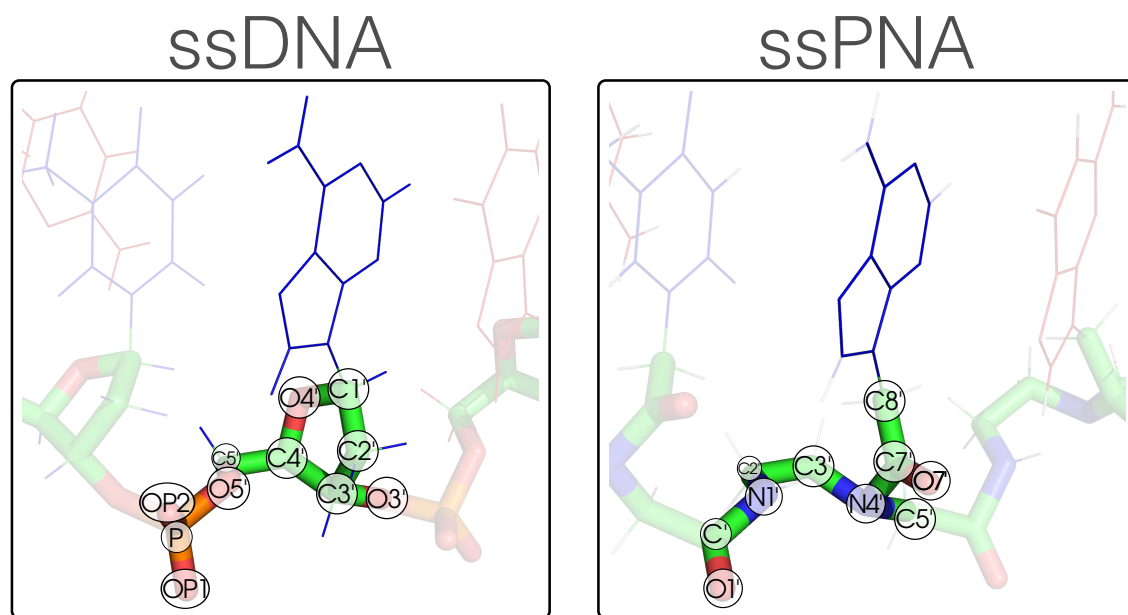


Abbildung 4.8: Ausschnitt des Anti-E2-Aptamers (links) mit einem Ausschnitt der erzeugten ssPNA (rechts) gegenübergestellt. Die Basen sind als Linien- und das Rückgrat als Stick-Modell dargestellt. Rückgrat Atome sind mit PDB Format vorgegeben Bezeichnung gekennzeichnet sowie mit Atom typischen Farben eingefärbt.

5 Diskussion

5.1 Bindungscharakter von 17β -Estradiol

Das Hauptaugenmerk galt den Wasserstoffbrückenbindungen und Stacking-Interactions, denn diese Bindungstypen bilden die Strukturkompatibilität zwischen dem Anti-E2-Aptamer sowie ssPNA und E2. Durch die Charakterisierung war es möglich, die facettenreichen Bildungsmöglichkeiten von E2 abzugrenzen, um damit mögliche molekulare Mechanismen für die E2-Aptamer-Komplex Bildung abzuleiten. Von Besonderer Bedeutung könnten die daher die Bindungslänge der Wasserstoffbrückenbindungen und Stacking-Interaktionen sein. Die E2 Bindungen in den Proteinstrukturen können auf 3D Ebene detektiert werden. Durch Betrachtung in der Proteinstruktur können Distanzen zu hydrophoben Aminosäuren gemessen werden. Bei nachfolgenden MD Simulation des Anti-E2-Aptamer in Komplex mit E2, kann das E2 Molekül in Reichweite der gefalteten ssDNA Struktur gebracht werden, speziell in die Schleifenregionen. Dieser Umstand würde zu verkürzten Simulationszeiten und längeren Beobachtung der Bindungsstabilität führen.

5.2 Sekundärstrukturelemente des Anti-E2-Aptamers

Die drei Ergebnisse der Mfold Sekundärstrukturvorhersage wurden mit der Sekundärstruktur aus der Publikation von KIM ET AL. verglichen. Die Sekundärstrukturen **A**, **B** und **C** wiesen untereinander 19 gleiche Stapelregionen und drei Schleifen, die in jeder der drei Strukturen auf gleiche Weise vorhergesagt wurden. Dabei stellte sich heraus, dass die Sekundärstruktur **A** identisch mit der aus der Arbeit von KIM ET AL. ist. Die auftretenden Regionen und deren Häufigkeit stimmen demnach überein. In Abbildung 5.1 sind diese gegenübergestellt. Diese unterscheiden sich in der Anordnung der Stapelregion mit fünf Basenpaarungen und in der Ausrichtung der Haarnadelschleife (Basenabfolge 29 bis 28). Die zwei weiteren vorhergesagten Sekundärstrukturen **B** und **C** besitzen eine höhere Abweichung in Bezug auf deren Sekundärstrukturelemente. Die Struktur **A** gilt daher als geeigneter Kandidat für Ausbildung der Sekundärstrukturelemente in der 3D Struktur. Auf Basis dieser Vorhergesagten Sekundärstruktur, können die einzelnen Sekundärstrukturelemente separiert werden und überprüft werden, ob diese die gleiche Sekundärstruktur annehmen.

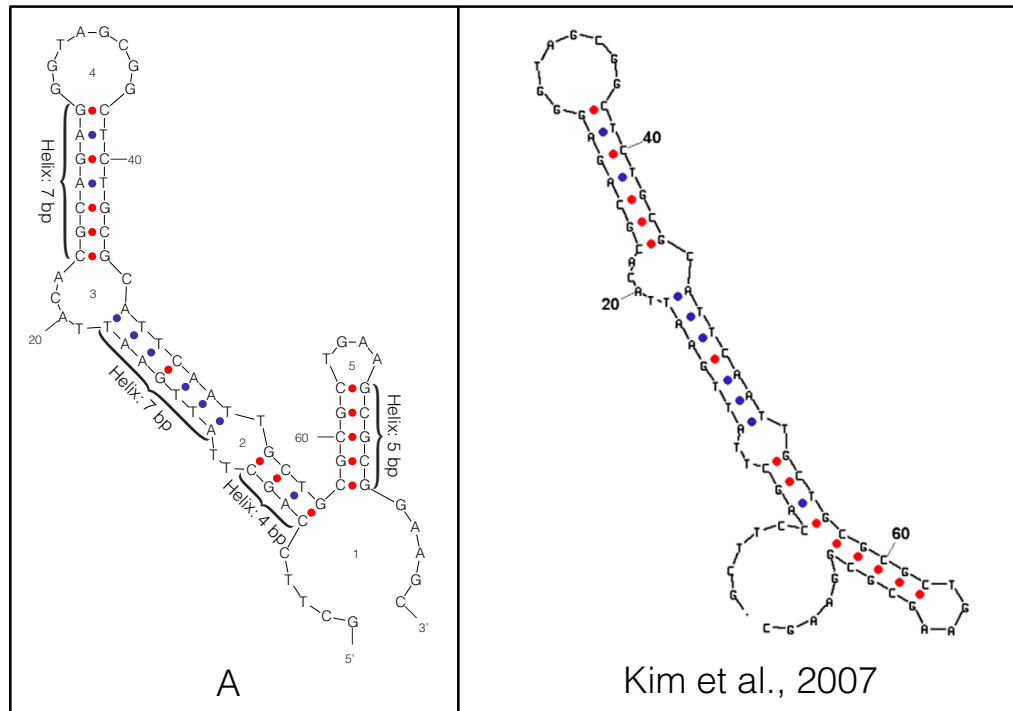


Abbildung 5.1: Vergleich der Vorhergesagten Sekundärstruktur **A** mit der Sekundärstruktur aus der KIM ET AL. Publikation.

5.2.1 Sekundärstrukturelemente der Substrukturen des Anti-E2-Aptamers

Die Verkürzung und deren Vorhersage mit dem Programm Mfold ergaben jeweils ein Ergebnis. Diese Vorhersagen stimmen mit den extrahierten Regionen aus der Anti-E2-Aptamer Sekundärstruktur überein. Die Haarnadelschleifen sind demnach stabil genug, dass diese sich, separiert von der Anti-E2-Aptamer Sequenz, in die selbige Struktur begibt.

5.3 Molekulardynamische Simulation des Anti-E2-Aptamers

Die MD Simulation des Anti-E2-Aptamers die in der 33,69 nm³ großen Simulationsbox angestrebt wurde, führte zum Abbruch der Simulation. Die Hardwarekomponenten, insbesondere der Grafikkartenspeicher, der Workstation konnten das System nicht Laden. Der gesamte Grafikkartenspeicher, von 4 x 6.144 MB RAM, ist in der Lage die Simulation parallelisiert durchzuführen. Zuvor muss jedoch das Simulationssystem in einen der vier Grafikkartenspeicher, der als Controller fungiert, geladen werden. Die Verteilung auf die weiteren drei Speicher über nimmt der Controller, dieser ist ausschließlich für die Überwachung des Simulationsablauf verantwortlich. Das Simulationssystem über-

steigt demzufolge die Speicherkapazität von 6.144 MB. Eine kleinere Simulationsbox die einen gewählten Abstand von 3, 2 oder 1 nm, von der Boxbegrenzung bis zum Molekül, besitzt, wurde anhand des Modellierungsverfahrens erzeugt. Da jedoch nicht eindeutig feststellbar ist, wie das ssDNA Molekül sich in der Simulationsbox verhält und welche Ausmaße die Faltung annimmt, muss eine ausreichend große Simulationsbox zur Verfügung gestellt werden. Diese sind mit den Abständen 3, 2 oder 1 nm nicht gewährleistet. Eine Aufstockung der Hardwarekomponenten kann zur Simulation von großen System beitragen. Prinzipiell ist es sinnvoll Systeme in Sekundärstrukturen aufzuteilen und die Bindungen eines Liganden an diesen zu beobachten. Dabei sollten Kürzungen auf Schleifenregionen die mit Stapelregionen geknüpft sind begrenzt sein.

5.3.1 Molekulardynamische Simulation des AE2A-S1

Die durchgeführte MD Simulation des AE2A-S1 Moleküls konnte in den ersten Ansätzen bestehen, war jedoch auf Grund der verkürzten Simulationszeit mit 17,59 ns von den Angestrebten 20 ns nicht vollständig. Die Faltung konnte daher nicht ganzheitlich beobachtet werden. Weiterhin haben die Diagrammauswertungen der ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen gezeigt (siehe Abbildung 4.6 und 4.7, Seite 40), dass die Faltung lediglich Ansatzweise simuliert werden konnte. Eine Distanzspezifizierung der H-Brücken macht deutlich, dass sich keine Helix sowie Schleifenregionen ausgebildet haben. In Abbildung 5.2 sind die Folgen einer zu hoch gewählten Distanz von 3.5 Å der H-Brücken zu erkennen. Es bilden sich Wasserstoffbrücken mit komplementären benachbarten Basen aus. Dieses Phänomen konnte auch bei der Distanzwahl von 2.5 Å beobachtet werden [Sakamoto et al., 2005]. Da bei natürlichen Distanzen keine H-Brücken gebildet haben, konnte damit auch keine von der vorgesagten Sekundärstrukturen eingenommen werden.

Die Parametrisierung der MD Simulation ist vielschichtig. Veränderung am Simulationssystem reagieren sensibel auf minimale Einflüsse und können in den Anfangsphasen der durchgeführten MD Simulation überblickt werden. Jeder Durchlauf bringt einen erhöhten zeitlichen Aufwand mit sich. Die Effizienz kann durch kleinere Systeme gesteigert werden, d.h. durch kleine Simulationsboxen und weitere Kürzungen des Anit-E2-Aptamers. Weiterhin können andere Kraftfelder bei der MD Simulation eingesetzt werden. Beispielsweise wurden bei einer MD Simulation mit dem AMBER94 eine Induced-Fit Bindung eines DNA Aptamers mit L-Arginin als Liganden simuliert [Lin et al., 2012]. Die Konfiguration des Softwareframework OpenMM über die Anwenderschnittstelle Python, vereinfacht die Bedienung und ist für unkomplizierte Anpassungen geeignet.

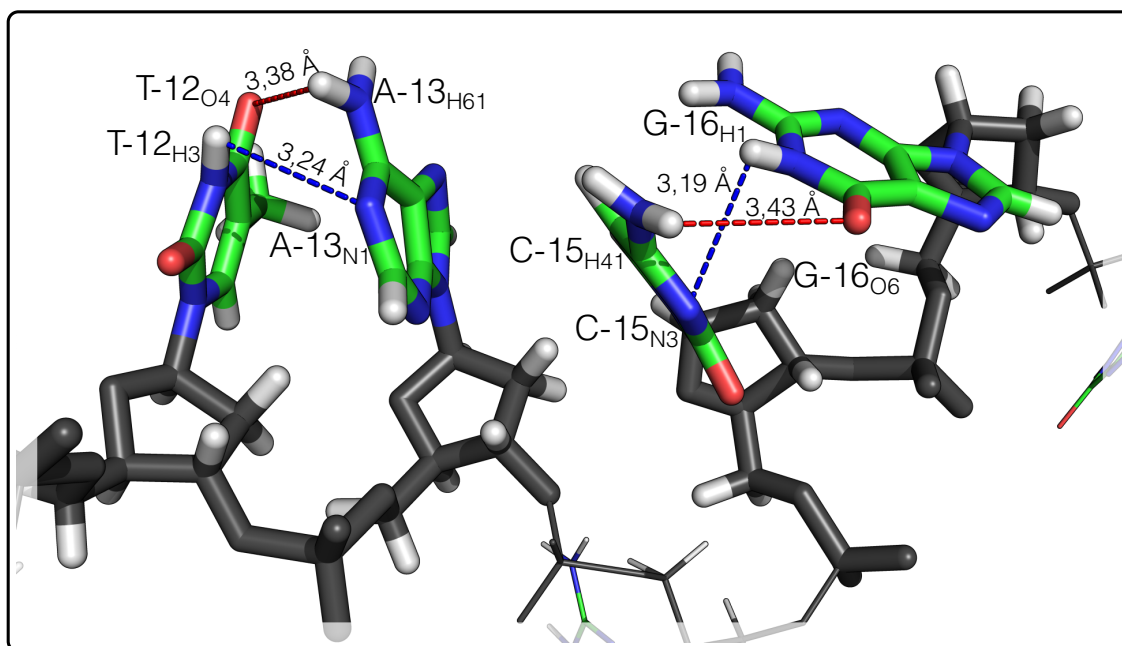


Abbildung 5.2: Ausschnitt des Simulierten AE2A-S1 zum Zeitpunkt 2,49 ns zeigt vier von den fünf ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen bei maximaler Distanz von 3,5 Å. Die H-Brücken bilden sich mit den benachbarten Basen T-12 und A-13 sowie C-15 und G-16 aus. Die ausgebildeten H-Brücken sind in blau und rot gestrichelten Linien inklusive Distanzen dargestellt.

5.4 Überführung in ssPNA

Der im Java erstellte Konverter kann für ssDNA und dsDNA eingesetzt und kann mit Anwendungen, die im Hochdurchsatz Daten verarbeiten, gekoppelt werden. Die Austauschmethode, die die DNA Rückgratatomsequenz $O5'-C5'-C4'-C3'-C2'-C1'-O3'-P$ in die Atome des PNA Rückgrats $N1'-C2'-C3'-N3'-N4'-C7'-C8'-C5'-C'$ überführt, ist in der Lage die Koordinaten zu übernehmen und an dessen Position ein neues Element mit spezifischer Atombezeichnung zu generieren. Eine Methodenerweiterung kann durch eine Funktion, welche die Distanzen aus vorgegebenen Referenzen und mit dem Benachbarten Atompaaren überprüft sowie im selbigen Modellierungsschritt die Länge anpasst, erweitert werden. Die Entfernung der nicht benötigten Atome OP1, OP2 und O4', ist unter gegebenen Bedingungen ausreichend. Zusätzliche Parameter sollten jedoch dem Nutzer die Möglichkeit bieten ein Atom oder eine Atomgruppe zu wählen die entfernt werden sollen. Die Rekonstruktion der fehlenden PNA Rückgratatomsequenzen O1' und O7' wurde durch Vektorbrechungen auf der Basis der Atome in der DNA berechnet. Die vordefinierte Bindungslänge von 1,2 Å soll dynamisch angepasst werden. Weiterhin sollte eine Korrekturmethode implementiert werden, welche die Lage des erzeugten Atoms über Winkel, Torsionswinkel und Distanzen zu umgebenden Atomen abgleicht und im selbigen Modellierungsschritt die Lage modifizieren kann. Die komplettierte Überführung von DNA zu PNA wird in das PDB File Format gespeichert. Auch in diesem Teil des Java Programm bestehen Möglichkeiten der Erweiterung. Es könnte eine alterna-

tive zum PDB Format angeboten werden, beispielsweise eine XML-Basierte Ausgabe. Zusätzlich könnte eine Pymol Ausgabe zur Verfügung gestellt werden, die Modifizierte Bereich farbig Markiert und Automatisiert Bindungslängen sowie Winkel.

Die Implementierung des PNA Generators als Webservice kann eine Verfügbarkeit auf globaler Ebene ermöglichen. Vordergründig sollte bei der Einrichtung und Organisation eines solchen Service neben der Benutzerfreundlichkeit, die hohe Verfügbarkeit im Mittelpunkt stehen. Zusätzlich sollte die Ausfallrate minimiert werden, eine Leistungsstarke Workstation optimiert Konfiguriert und eine performante Prozessverteilung zu Grunde liegen. Kommunikationen des Webservice mit dem Nutzer können über E-Mail Benachrichtigungen realisiert werden. Weiterhin kann eine ausführliche Beispielanwendung dem Nutzer facettenreiche Möglichkeiten geboten werden. Durch integrierte Kreuzverlinkungen zu etablierten Datenbanken kann dem Nutzer themenbasierte Netzwerke geboten werden.

6 Schlussfolgerung

Der Bindungscharakter von E2 konnte für die 28 Proteinstrukturen bestimmt und auf die DNA bindungstypische Charakteristik übertragen werden. Die Bestimmung wurde über PoseView realisiert. Eine detailliertere Aussage über Bindungscharakter in den Strukturen, kann über die Betrachtung auf 3D Ebene getroffen werden. Prinzipiell wurden die zugrundeliegenden Bindungstypen identifiziert und für die zukünftige Bindung mit dem ssDNA sowie ssPNA in Betracht gezogen. Bindungslängen könnten weiterhin zur Evaluierung bei der Bindung zwischen E2 und den Oligonukleotiden zum Einsatz kommen. Der Vergleich könnte demnach Aussagen im Bezug auf die Korrektheit der ausgebildeten Bindung liefern.

Aus den vorhersagten Sekundärstrukturen konnte ein möglicher Kandidat für die simulierte und reale Faltung des Anti-E2-Aptamer bestimmt werden. Einer der drei vorhergesagten Strukturen, weist identische Sekundärstrukturelement mit der Vorgesagten Struktur aus der KIM ET AL. Publikation aus dem Jahr 2007 auf. Die drei vorhergesagten Sekundärstrukturen bildeten gleichermaßen ähnliche Regionen aus. Die Zerlegung in einzelne Sekundärstrukturen, speziell in zwei Haarnadelschleifen konnten durch vorhergesagte, mit dem Programm Mfold, die selbige Struktur einnehmen. Die daraus entstandene Anti-E2-Aptamer Subsequenz AE2A-S1 wurde über die 10 Modellierungsschritte, für die MD Simulation vorbereitet und anschließend simuliert.

Die Modellierungsschritte mit dem AMBER NAB Tool und den GROMACS Tools konnte ein Simulationsbox generiert werden, die Ladungsneutral und mit Lösungsmittel versehen ist. Die anschließende MD Simulation der Faltung mit dem Softwareframework OpenMM, konnte erfolgreich aufgesetzt werden. Die Parametrisierung konnte hingegen noch nicht vollständig für die Faltung konfiguriert werden. Die Faltung in der MD Simulation war für 20 ns angesetzt. Auf Grund des hohen zeitlichen Aufwands der Simulation, konnte lediglich eine Simulationszeit von 17,6 ns erreicht werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich keine Sekundärstrukturen während der simulierten Faltung ausbilden. Natürliche Bindungslängen zwischen den komplementären Basenpaarungen konnten ebenfalls nicht beobachtet werden. Unklar ist bisher im welchen zeitlichen Verlauf sich die ssDNA faltet. Grundlegend wurden alle Bedingungen für die MD Simulation gegeben und das Verfahren kann auf andere ssDNA übertragen werden.

Die Konvertierung von ssDNA in ssPNA konnte erfolgreich umgesetzt werden. Der Austausch des Zuckerphosphat-Rückgrat durch ein Polyamid-Rückgrat wurde über die Entfernung der nicht in PNA vorkommenden Atome, durch den Austausch von Atomen sowie durch hinzufügen fehlender Atome, realisiert. Daraus hat sich eine plattformunabhängige Java Software etabliert und kann für die Überführung beliebiger DNA Stränge in PNA eingesetzt werden.

7 Ausblick

Die Bindungscharakterisierung von E2 kann in den 3D Raum Übertragen werden. Weiterhin kann eine Software entwickelt werden, die Distanzen in Proteinstrukturen, welche E2 als Liganden binden, berechnet. Die Bindungslängen könnten bei der Induced Fit Bindung aus über den Konformationswechsel geben. Die MD Simulation soll Kenntnisse über den Bindungsprozess sowie deren Wechselwirkungen liefern. Vordergründig müssen die MD Parameter modifiziert werden, damit eine korrekte Faltung des Anti-E2-Aptamers zustande kommt. Gegebenenfalls kommt dazu ein weiteres DNA spezifisches Kraftfeld zum Einsatz. Für die *in silico* Identifizierung des Binungsmotifs kann das Kraftfeld AMBER94 verwendet werden. Diese wurde bereits erfolgreich bei der *in silico* Bindung eines DNA Aptamers mit L-Arginin als Liganden beobachtet [Lin et al., 2012]. Der etablierte methodische Ablauf (siehe Abbildung 7.1) kann auf weitere Liganden, die in Gewässern diktiert wurden, überführt werden. Möglich ist auch weitere Aptamere zu Modellierung und die hier vorgestellte Methodik darauf anzuwenden um Bindungsmotive ausfindig zu machen. Ferner soll eine Aptamer-basierte Filtertechnologie entwickelt werden, welche in der Lage ist endokrine Disruptoren spezifisch und rückstandslos aus Gewässern zu entfernen. In Abbildung 7.2 ist das Funktionsprinzip des Filters dargestellt.

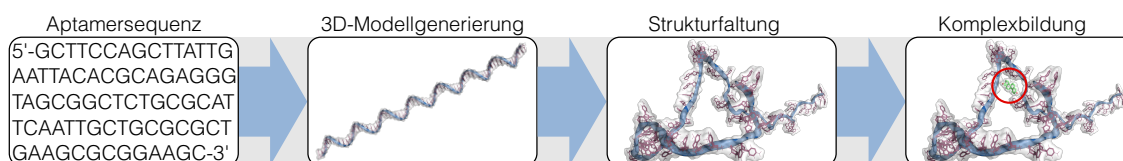


Abbildung 7.1: Schematische Flussdiagramm der Evaluation und Modellierung des Anti-E2-Aptamers und deren komplexe Ausbildung mit E2.

Funktionelle Erweiterungen des PNA Generators kann zur dynamischen Bedienbarkeit beitragen. Eine Implementierung als Webserver soll ebenfalls realisiert werden, damit auch Forschungseinrichtungen, Labore und Institute DNA in PNA *in silico* konvertieren können. Weiterhin könnte die Software als quelloffene und plattformunabhängiges Tool zum Download angeboten werden. Dadurch kann die Software im Hochdurchsatz angewandt werden. Die hier vorgestellte Methodik der Strukturfaltung und Bindung mit E2 soll auf die robustere PNA übertragen werden. Dadurch ist eine *in vivo* Anwendung möglich, die pharmakologisch wirksame Stoffe aus Gewässern entfernen kann. Die Simulation von PNA benötigt ein spezifisches PNA Kraftfeld welches auf der REDDB Datenbank⁸ zur Verfügung gestellt wird [Dupradeau et al., 2008]. Zuvor muss diese in ein OpenMM passendes Format überführt werden.

⁸ <http://q4md-forcefieldtools.org/REDDB/projects/F-93/>

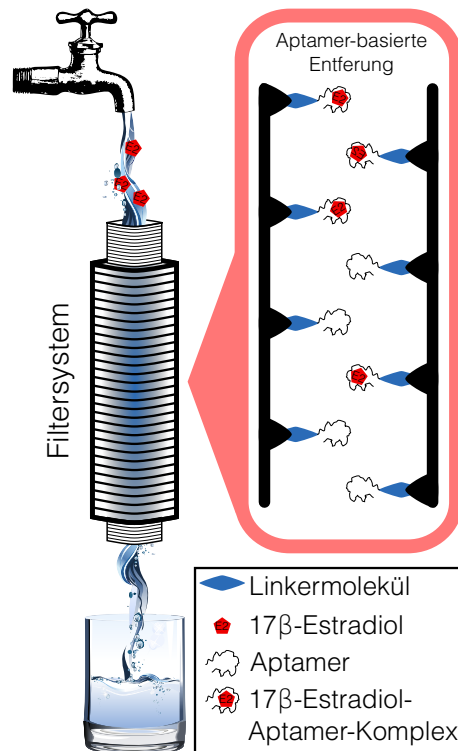


Abbildung 7.2: Konzeptüberblick über eine mögliche Filterpatrone. Darstellung einer möglichen Filterpatrone für die rückstandslose Entfernung von pharmakologisch wirksamen Stoffen aus dem Trinkwasser. Wasser fließt von oben in das Filtersystem und wird durch spezifische Aptamere gereinigt. Diese Aptamere sind mit Linkermolekülen (blaue Raute) innerhalb des Filters auf die Oberfläche immobilisiert (z. B. modifizierte Glasbeads, Glasfaser oder Goldpartikeln) und absorbieren die E2-Moleküle (rot).

Anhang A: Anhang Methoden

A.1 Bindungscharakter von 17 β -Estradiol (E2)

Tabelle A.1: Auflistung alle 28 existierenden Proteinstrukturen aus der PDB die E2 als Liganden binden: Nummerierung, PDBID, Auflösung der Röntgenstrukturanalyse in Å, Beschreibung, gebundene Liganden, Organismus und Referenz.

Nr.	PDBID	Resolution [Å]	Beschreibung	Liganden	Organismus	Referenz
1	1A27	1,90	Human Type I 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase C-Terminale Deletion Mutante, komplexiert mit E2 und NADP ⁺	E2, NADP ⁺	<i>Homo sapiens</i>	[Mazza et al., 1998]
2	1A52	2,80	Estrogenrezeptor α LBD in Komplex mit E2	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Tanenbaum et al., 1998]
3	1AQU	1,60	Estrogen Sulfotransferase mit gebundenem inaktiven Kofaktor PAP und E2	E2, PAP	<i>Mus musculus</i>	[Kakuta et al., 1997]
4	1E6W	1,70	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase aus dem Rattengehirn, binär komplexiert mit E2 und NADP	E2, NADP	<i>Rattus norvegicus</i>	[Powell et al., 2000]
5	1ERE	3,10	Human Estrogen Rezeptor α LBD in Komplex mit E2	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Brzozowski et al., 1997]
6	1FDS	1,70	Human Type I 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, komplexiert mit E2	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Breton et al., 1996]
7	1FDT	2,20	Human Type I 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, komplexiert mit E2 und NADP ⁺	E2, NADP ⁺	<i>Homo sapiens</i>	[Breton et al., 1996]
8	1FDU	2,70	Human Type I 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Mutante H221L, komplexiert mit E2 und NADP ⁺	E2, NADP ⁺	<i>Homo sapiens</i>	[Mazza et al., 1998]
9	1FDW	2,70	Human Type I 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Mutante H221Q, komplexiert mit E2	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Mazza et al., 1998]
10	1G50	2,90	Kristallstruktur von Estrogen Rezeptor α LBD (Wildtyp)	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Eiler et al., 2001]
11	1GWR	2,40	Human Estrogen Rezeptor α LBD in Komplex mit E2 und TIF2 NR BOX 3 Peptid	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Warnmark et al., 2002]
12	1IOL	2,30	Estrogen 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, komplexiert mit E2	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Azzi et al., 1996]
13	1JGL	2,15	Kristallstruktur von Immunglobulin Fab-Fragment in Komplex mit E2	E2	<i>Mus musculus</i>	[Lamminmaki and Kankare, 2001]
14	1JNN	3,20	Kristallstruktur von Fab-E2 Komplexen	E2	<i>Mus musculus</i>	[Monnet et al., 2002]

15	1LHU	1,80	Kristallstruktur der N-Terminalen LG-Domäne des SHBG in Komplex mit E2	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Grishkovskaya et al., 2002]
16	1PCG	2,70	Helix-stabilisierte zyklische Peptide als selektive Inhibitoren der Steroid-Rezeptor-Coaktivator Interaktionen	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Leduc et al., 2003]
17	1QKT	2,20	Mutante Estrogen NR LBD	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Gangloff et al., 2001]
18	1QKU	3,20	Wildtype Estrogen NR LBD	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Gangloff et al., 2001]
19	2D06	2,30	Human Sulfotransferase 1A1 komplexiert mit PAP und E2	E2, PAP	<i>Homo sapiens</i>	[Gamage et al., 2005]
20	2J7X	2,10	Struktur des E2 bindende Estrogenrezeptor β LBD in Komplex mit dem LXXLL Motif aus NCOA5	E2	<i>Rattus norvegicus</i>	To be Published
21	2OCF	2,95	Human Estrogenrezeptor α LBD in Komplex mit E2 und dem E2#23 FN3 Monobody	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Koide et al., 2002]
22	2YJA	1,82	geheftete bindende Peptide des Estrogenrezeptor α	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Phillips et al., 2011]
23	3OLL	1,50	Kristallstruktur der phosphorylierten Estrogenrezeptor β LBD	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Mocklinghoff et al., 2010]
24	3OLS	2,20	Kristallstruktur der Estrogenrezeptor β LBD	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Mocklinghoff et al., 2010]
25	3UUD	1,6	Kristallstruktur der Estrogenrezeptor α LBD Mutante Y537S in Komplex mit E2	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Delfosse et al., 2012]
26	4J24	2,10	Estrogenrezeptor in Komplex mit Prolin frankierten LXXLL Peptiden	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Fuchs et al., 2013]
27	4J26	2,30	Estrogenrezeptor in Komplex mit Prolin frankierten LXXLL Peptiden	E2	<i>Homo sapiens</i>	[Fuchs et al., 2013]
28	4JVL	1,94	Kristallstruktur der Human Estrogen Sulfotransferase mit gebundenem inaktiven Kofaktor PAP und E2	E2, PAP	<i>Homo sapiens</i>	[Gosavi et al., 2013]

A.2 PoseView Diagramm der 28 E2 bindenden Proteinstrukturen

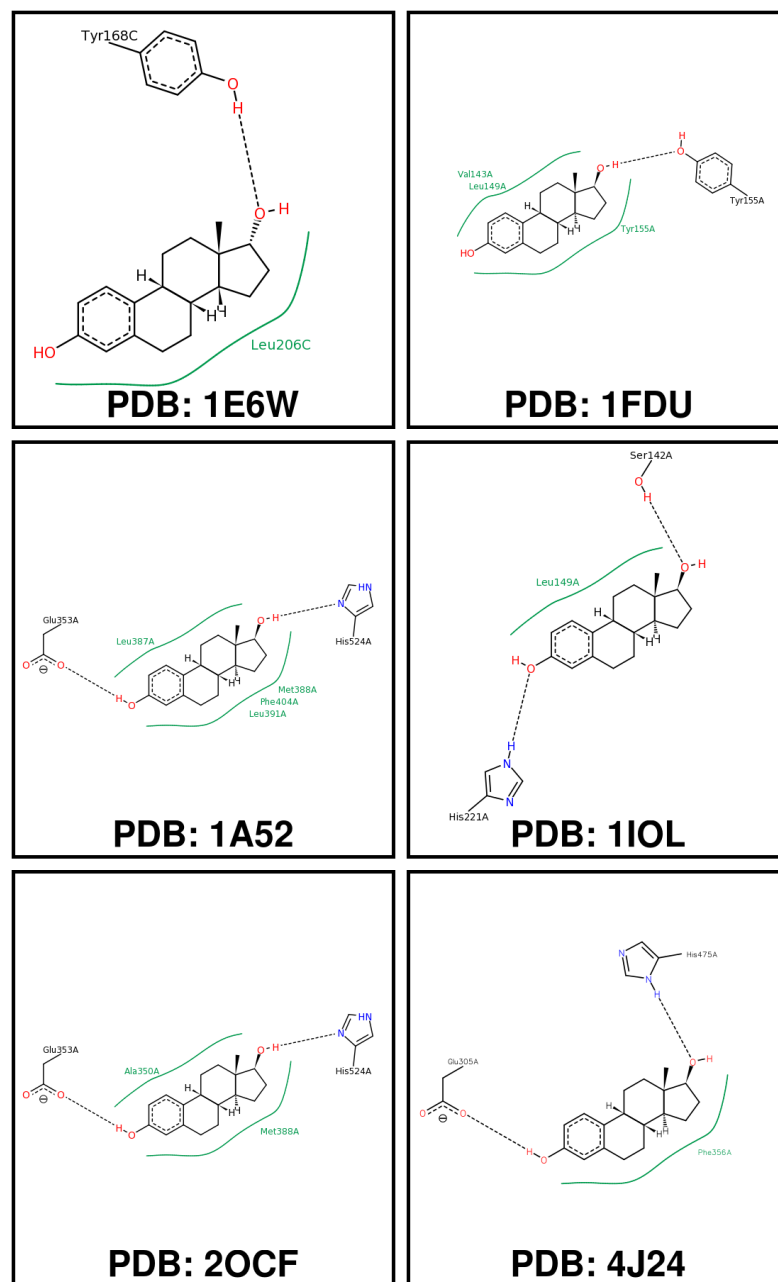


Abbildung A.1: PoseView Diagramme der Proteinstrukturen PDBID: 1E6W, 1FDU, 1A52, 1IOL, 2OCF, 4J24. Die schwarz gestrichelte Linie zeigt die ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindung und grüne Linien zeigen die hydrophoben Wechselwirkungen, die zwischen dem E2 Molekül und den Aminosäuren des Proteins wirken.

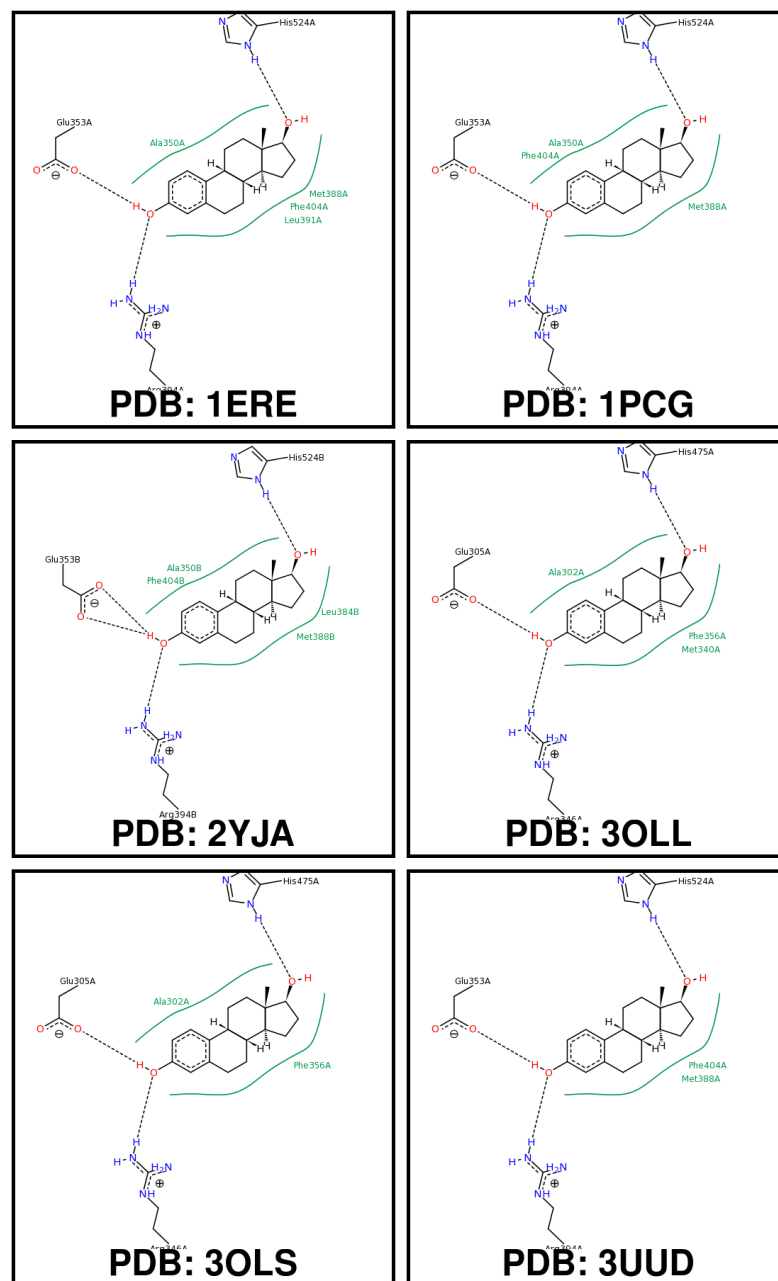


Abbildung A.2: PoseView Diagramme der Proteinstrukturen PDBID: 1ERE, 1PCG, 2YJA, 3OLL, 3OLS, 3UUD. Die schwarz gestrichelte Linie zeigt die ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindung und grüne Linien zeigen die hydrophoben Wechselwirkungen, die zwischen dem E2 Molekül und den Aminosäuren des Proteins wirken.

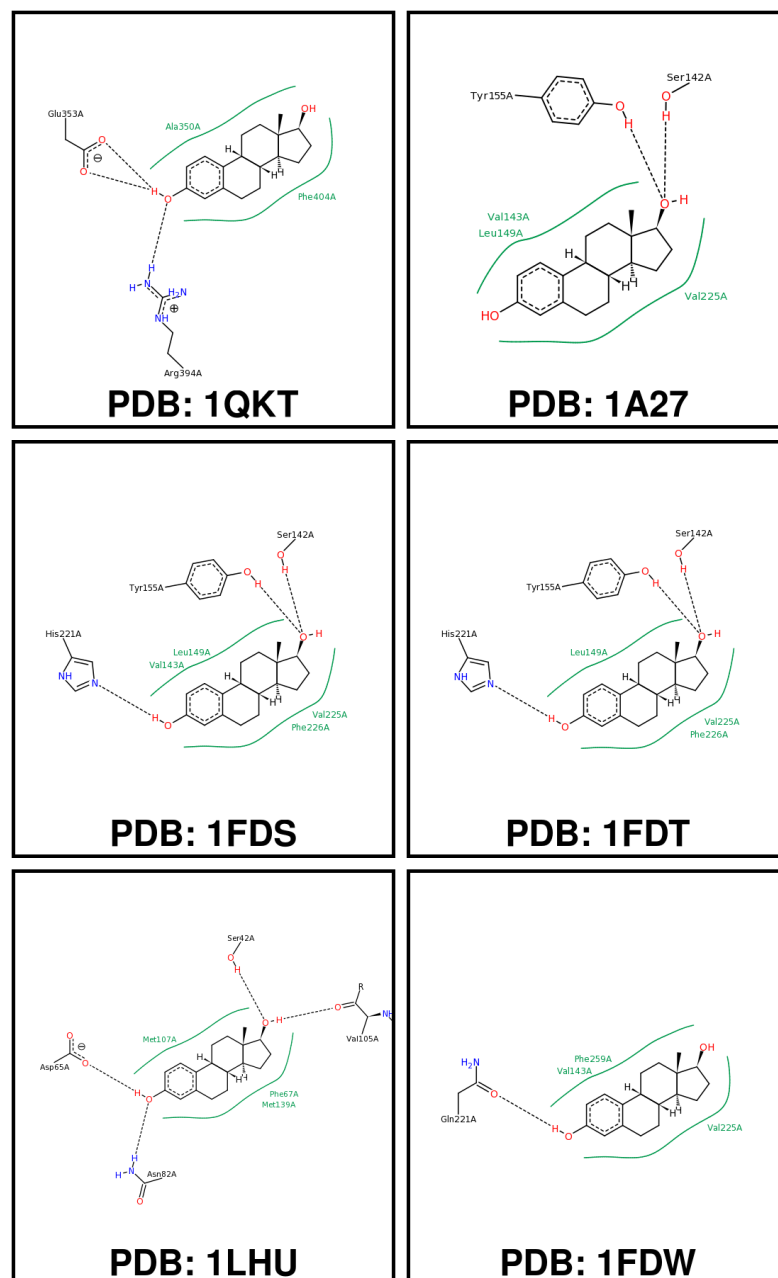


Abbildung A.3: PoseView Diagramme der Proteinstrukturen PDBID: 1QKT, 1A27, 1FDS, 1FDT, 1LHU, 1FDW. Die schwarz gestrichelte Linie zeigt die ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindung und grüne Linien zeigen die hydrophoben Wechselwirkungen, die zwischen dem E2 Molekül und den Aminosäuren des Proteins wirken.

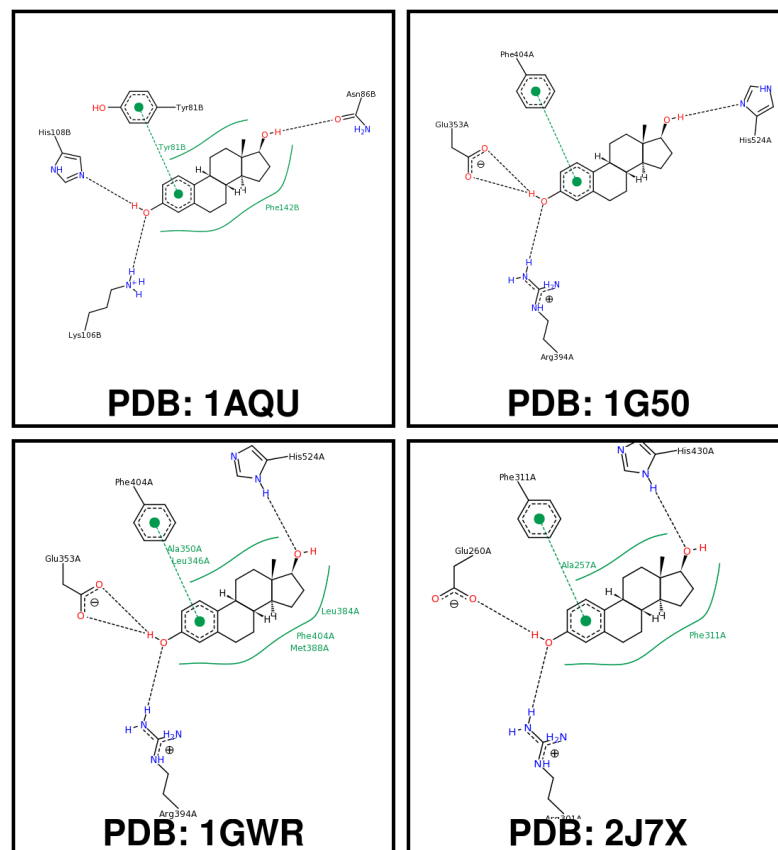


Abbildung A.4: PoseView Diagramme der Proteinstrukturen PDBID: 1AQU, 1G50, 1GWR, 2J7X. Die schwarz gestrichelte Linie zeigt die ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindung, π - π -Wechselwirkungen werden als grüne gestrichelte Linie dargestellt und grüne Linien zeigen die hydrophoben Wechselwirkungen, die zwischen dem E2 Molekül und den Aminosäuren des Proteins wirken.

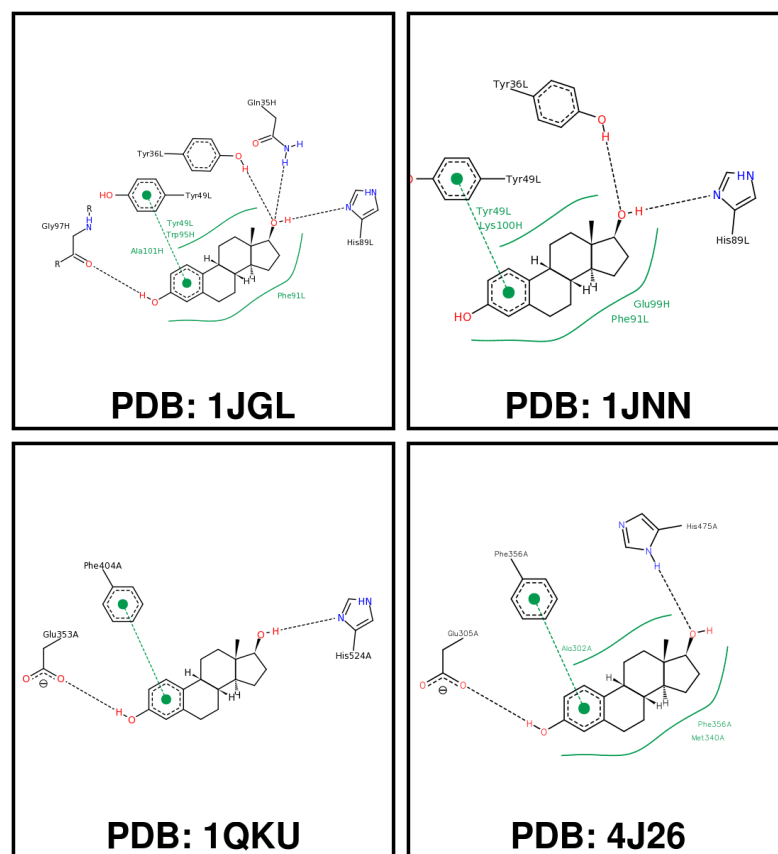


Abbildung A.5: PoseView Diagramme der Proteinstrukturen PDBID: 1JGL, 1JNN, 1QKU, 4J26. Die schwarz gestrichelte Linie zeigt die ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindung, π - π -Wechselwirkungen werden als grüne gestrichelte Linie dargestellt und grüne Linien zeigen die hydrophoben Wechselwirkungen, die zwischen dem E2 Molekül und den Aminosäuren des Proteins wirken.

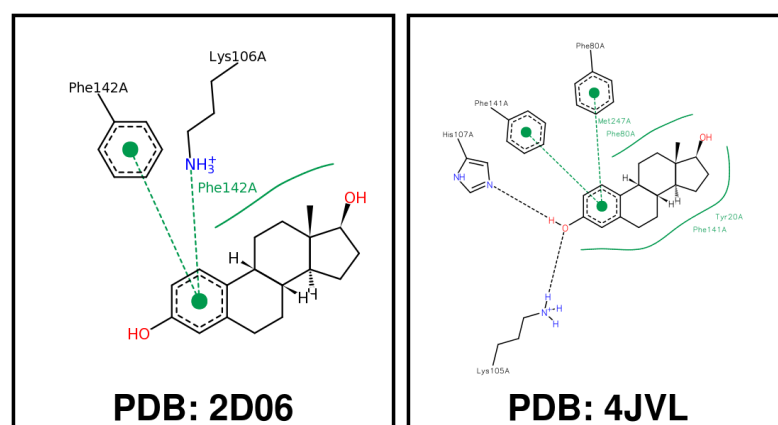


Abbildung A.6: PoseView Diagramme der Proteinstrukturen PDBID: 2D06, 4JVL. Die schwarz gestrichelte Linie zeigt die ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindung, π - π - sowie π -Kation Wechselwirkungen werden als grüne gestrichelte Linie dargestellt und die grüne Linien zeigen die hydrophoben Wechselwirkungen, die zwischen dem E2 Molekül und den Aminosäuren des Proteins wirken.

A.3 Molekulardynamik Python Skript

```
1  from simtk.openmm.app import *
2  from simtk.openmm import *
3  from simtk.unit import *
4  from sys import stdout
5
6  print('Loading structure...')
7  pdb = PDBFile('nuc_ssDNA_solv_ions.pdb')
8
9  # define force field, water topology
10 forcefield = ForceField('amber96.xml', 'tip3p.xml')
11
12 # generate modeller, add hydrogens, solvate in 1 nm
   padding box and neutralize
13 modeller = Modeller(pdb.topology, pdb.positions)
14
15 # create system using modeller topology
16 print('Creating system...')
17 system = forcefield.createSystem(modeller.topology,
   nonbondedMethod=PME, nonbondedCutoff=1*nanometer)
18
19 # create integrator to perform Langevin dynamics (
   temperature, friction coefficient, timestep)
20 system.addForce(MonteCarloBarostat(1.01325*bar, 300*
   kelvin))
21 integrator = LangevinIntegrator(300*kelvin, 1/picosecond
   , 0.001*picoseconds)
22 platform = Platform.getPlatformByName('CUDA')
23 properties = {'CudaDeviceIndex': '0,1,2,3', '
   CudaPrecision': 'double'}
24
25 # create simulation using initial PDB atom positions
26 print('Creating simulation...')
27 simulation = Simulation(modeller.topology, system,
   integrator, platform, properties)
28 simulation.context.setPositions(modeller.positions)
29
30 # perform local energy minimization first
31 print('Minimizing energy...')
32 simulation.minimizeEnergy()
33
34 #print('Saving minimized structure...')
35 positions = simulation.context.getState(getPositions=
   True).getPositions()
36 PDBFile.writeFile(simulation.topology, positions, open('
   nuc_edited_minimized.pdb', 'w'))
37 # append reporter to write trajectory every 1000
   timesteps and print to console
```

```
38     simulation.reporters.append(PDBReporter('
39         nuc_edited_trajectory.pdb', 10000))
simulation.reporters.append(StateDataReporter(open('
40     simulatePdb.log', 'w'), 1000, step=True,
41     kineticEnergy=True, potentialEnergy=True, totalEnergy
42     =True, temperature=True, volume=True, density=True))
43
44     print('Starting simulation...')
45     # START simulation
46     simulation.step(20000000)
```

Anhang B: Anhang Ergebnisse

B.1 Sekundärstrukturelemente des Anti-E2-Aptamers

Tabelle B.1: Thermodynamik der Mfold Faltungsvorhersage des Anti-E2-Aptamer (**A**) mit minimaler freier Faltungsenergie von $-19,13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ bei einer Temperatur von 37°C .

Structural element	$\delta G \text{ [kcal}\cdot\text{mol}^{-1}]$	Information
External loop	-0.96	10 ss bases & 2 closing helices.
Stack	-2.17	External closing pair is C ₅₈ -G ₇₁
Stack	-2.24	External closing pair is G ₅₉ -C ₇₀
Stack	-2.17	External closing pair is C ₆₀ -G ₆₉
Stack	-2.24	External closing pair is G ₆₁ -C ₆₈
Hairpin loop	2.5	Closing pair is C ₆₂ -G ₆₇
Stack	-1.45	External closing pair is C ₆ -G ₅₇
Stack	-1.28	External closing pair is A ₇ -T ₅₆
Stack	-2.24	External closing pair is G ₈ -C ₅₅
Interior loop	1.6	External closing pair is C ₉ -G ₅₄
Stack	-0.88	External closing pair is A ₁₂ -T ₅₂
Stack	-1	External closing pair is T ₁₃ -A ₅₁
Stack	-1.45	External closing pair is T ₁₄ -A ₅₀
Stack	-1.3	External closing pair is G ₁₅ -C ₄₉
Stack	-1	External closing pair is A ₁₆ -T ₄₈
Stack	-0.88	External closing pair is A ₁₇ -T ₄₇
Interior loop	3.9	External closing pair is T ₁₈ -A ₄₆
Stack	-2.17	External closing pair is C ₂₃ -G ₄₄
Stack	-2.24	External closing pair is G ₂₄ -C ₄₃
Stack	-1.45	External closing pair is C ₂₅ -G ₄₂
Stack	-1.28	External closing pair is A ₂₆ -T ₄₁
Stack	-1.3	External closing pair is G ₂₇ -C ₄₀
Stack	-1.28	External closing pair is A ₂₈ -T ₃₉
Hairpin loop	3.3	Closing pair is G ₂₉ -C ₃₈
ΔG	-19.68	

Tabelle B.2: Thermodynamik der Mfold Faltungsvorhersage des Anti-E2-Aptamer (**B**) mit minimaler freier Faltungsenergie von $-19,44 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ bei einer Temperatur von 37°C .

Structural element	$\delta G \text{ [kcal}\cdot\text{mol}^{-1}]$	Information
External loop	0.00	0 ss bases & 1 closing helices.
Stack	-2.24	External closing pair is G ₁ -C ₇₆
Stack	-1.28	External closing pair is C ₂ -G ₇₅
Stack	-1.00	External closing pair is T ₃ -A ₇₄
Stack	-1.30	External closing pair is T ₄ -A ₇₃
Multi-loop	5.10	External closing pair is C ₅ -G ₇₂ 0 ss bases & 3 closing helices.
Stack	-2.17	External closing pair is C ₅₈ -G ₇₁
Stack	-2.24	External closing pair is G ₅₉ -C ₇₀
Stack	-2.17	External closing pair is C ₆₀ -G ₆₉
Stack	-2.24	External closing pair is G ₆₁ -C ₆₈
Hairpin loop	2.50	Closing pair is C ₆₂ -G ₆₇
Stack	-1.45	External closing pair is C ₆ -G ₅₇
Stack	-1.28	External closing pair is A ₇ -T ₅₆
Stack	-2.24	External closing pair is G ₈ -C ₅₅
Interior loop	1.60	External closing pair is C ₉ -G ₅₄
Stack	-0.88	External closing pair is A ₁₂ -T ₅₂
Stack	-1.00	External closing pair is T ₁₃ -A ₅₁
Stack	-1.45	External closing pair is T ₁₄ -A ₅₀
Stack	-1.30	External closing pair is G ₁₅ -C ₄₉
Stack	-1.00	External closing pair is A ₁₆ -T ₄₈
Stack	-0.88	External closing pair is A ₁₇ -T ₄₇
Interior loop	3.90	External closing pair is T ₁₈ -A ₄₆
Stack	-2.17	External closing pair is C ₂₃ -G ₄₄
Stack	-2.24	External closing pair is G ₂₄ -C ₄₃
Stack	-1.45	External closing pair is C ₂₅ -G ₄₂
Stack	-1.28	External closing pair is A ₂₆ -T ₄₁
Stack	-1.30	External closing pair is G ₂₇ -C ₄₀
Stack	-1.28	External closing pair is A ₂₈ -T ₃₉
Hairpin loop	3.30	Closing pair is G ₂₉ -C ₃₈
ΔG	-19.44	

Tabelle B.3: Thermodynamik der Mfold Faltungsvorhersage des Anti-E2-Aptamer (**C**) mit minimaler freier Faltungsenergie von $-19,13 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ bei einer Temperatur von 37°C .

Structural element	δG [$\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$]	Information
External loop	-1.79	3 ss bases & 3 closing helices.
Stack	-2.24	External closing pair is G ₅₄ -C ₇₆
Stack	-1.28	External closing pair is C ₅₅ -G ₇₅
Interior loop	1.50	External closing pair is T ₅₆ -A ₇₄
Stack	-2.17	External closing pair is C ₅₈ -G ₇₁
Stack	-2.24	External closing pair is G ₅₉ -C ₇₀
Stack	-2.17	External closing pair is C ₆₀ -G ₆₉
Stack	-2.24	External closing pair is G ₆₁ -C ₆₈
Hairpin loop	2.50	Closing pair is C ₆₂ -G ₆₇
Stack	-0.88	External closing pair is A ₁₂ -T ₅₂
Stack	-1.00	External closing pair is T ₁₃ -A ₅₁
Stack	-1.45	External closing pair is T ₁₄ -A ₅₀
Stack	-1.30	External closing pair is G ₁₅ -C ₄₉
Stack	-1.00	External closing pair is A ₁₆ -T ₄₈
Stack	-0.88	External closing pair is A ₁₇ -T ₄₇
Interior loop	3.90	External closing pair is T ₁₈ -A ₄₆
Stack	-2.17	External closing pair is C ₂₃ -G ₄₄
Stack	-2.24	External closing pair is G ₂₄ -C ₄₃
Stack	-1.45	External closing pair is C ₂₅ -G ₄₂
Stack	-1.28	External closing pair is A ₂₆ -T ₄₁
Stack	-1.30	External closing pair is G ₂₇ -C ₄₀
Stack	-1.28	External closing pair is A ₂₈ -T ₃₉
Hairpin loop	3.30	Closing pair is G ₂₉ -C ₃₈
Stack	-2.24	External closing pair is G ₁ -C ₉
Stack	-1.28	External closing pair is C ₂ -G ₈
Hairpin loop	3.55	Closing pair is T ₃ -A ₇
ΔG	-19.13	

Anhang C: Vorträge und Posterpräsentationen

Im Rahmen der Masterarbeit wurde die Fortschritte beim Saxon Biotechnology Symposium⁹ am 19.03.2014 in Dresden als Poster (siehe Anhang C.1) und bei der 15. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz¹⁰ (NWK 15) an der Hochschule Magdeburg-Stendal, Standort Magdeburg, als Vollbeitrag eingereicht (siehe Anhang C.2). Das Review Ergebnis des NWK 15 Gutachten (siehe Anhang C.3) bestätigt die Zusage und vergibt eine Gesamtpunktzahl von 80 Punkten von 100 möglichen. Der Beitrag wurde am 24.04.2013 in der zugewiesenen Session *2-2 Naturwissenschaften-2* präsentiert. Weiterhin wurde die Forschungsergebnisse auf der Himmelfahrtstagung¹¹ in Form eines Poster am 26. bis 25.05.2014 in Radebeul präsentiert.

C.1 Saxon Biotechnology Symposium 2014

⁹ <http://www.biotec.tu-dresden.de/sbtt2014/>

¹⁰ <https://www.hs-magdeburg.de/hochschule/aktuelles/veranstaltungen/nachwuchswissenschaftlerkonferenz-2014.html>

¹¹ <http://events.dechema.de/en/Biomaterials>

Potential of a novel aptamer-based filter system for endocrine disruptors and pharmaceutical drugs in drinking water



Alexander Eisold¹, Susanne Jacob¹, Carolin Pohl², Elke Boschke² and Dirk Labudde¹

Contact: aeisold@hs-mittweida.de, sjacob1@hs-mittweida.de, carolin.pohl@tu-dresden.de, elke.boschke@tu-dresden.de, labudde@hs-mittweida.de

¹Hochschule Mittweida – University of Applied Sciences, Technikumplatz 17, 09648 Mittweida, Germany

²Technical University Dresden, Institute of Food Technology and Bioprocess Engineering, Bergstraße 120, 01069 Dresden, Germany



Background

Traces of medicinal products in ground and drinking water are known to be a growing risk for the environment. Thus, in July 2013, European Parliament took appropriate action and added three drug compounds to the supervisory list for the first time. Therefore the compounds and their effects are under observation and possibly can be further incorporated into the list of priority compounds. This includes, among others, the endogenous and female sex steroid hormone 17 β -estradiol (E2) [5]. Since hormonal compounds damage the flora and fauna of water, E2 was registered on the supervisory list [3]. Furthermore a connection is known between raised breast cancer risk for the descendant generations of rats if E2 was given during pregnancy [1]. E2 and other chemicals are widespread in the modern livestock breeding and the effects have also been known for a long time [2]. The trace chemicals, excreted by humans and animals, are released with waste from hospitals or pharmaceutical and chemical industry plants. The entry paths of harmful products are shown in Figure 1. Furthermore the traces continue circulating and remain in the environment.

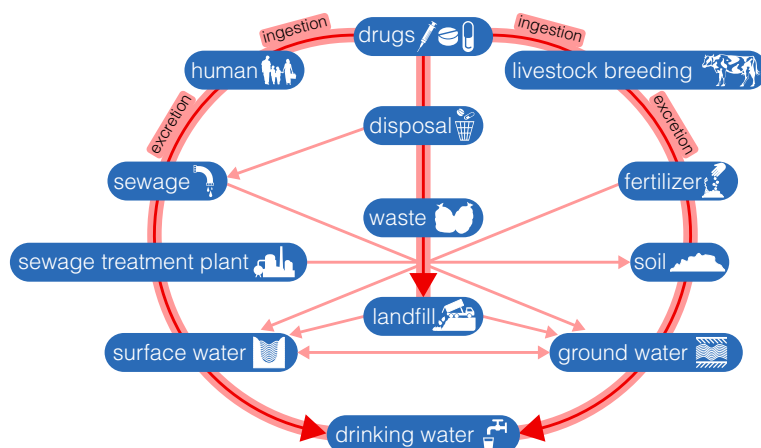
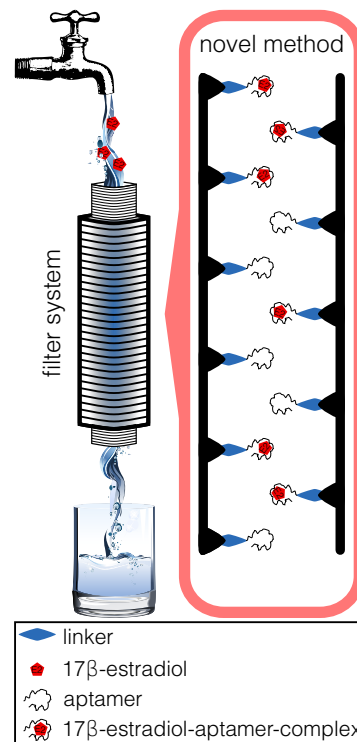


Figure 1: Schematic overview of the three major entry paths (bold red arrows) and their minor paths (light red arrows) of medical products in the drinking water [6].

Motivation



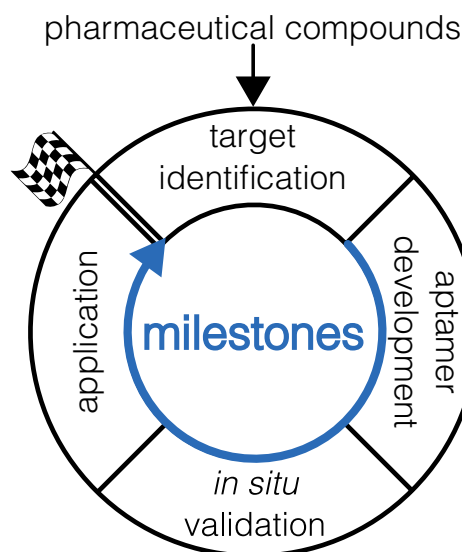
Aptamer excursus

Aptamers are single-stranded oligonucleotides of various length (<50 nt). Non-covalent interactions like hydrogen or disulfide bonds between bases enable aptamers to fold in complex three-dimensional structures. Also hydrophobic properties play important roles when in solution. Aptamers can yield high binding specificities various targets (e.g. molecules, peptides, proteins) with high affinity [4].

References

- [1] de Assis, S.; Warri, A. et al. *Nature Communications* **3**, p. 1053 (2012)
- [2] Jobling, S.; Reynolds, T. et al. *Environ. Health Perspect.* **103**, p. 582–587 (1995)
- [3] Kidd, K. A.; Blanchfield, P. J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, p. 8897–8901 (2007)
- [4] Kim, Y. S. Jung, H. S. et al. *Biosensors and Bioelectronics* **22**, p. 2525–2531 (2007)
- [5] Richtlinie 2013/39/EU des Rates vom 12. Aug 2013 (ABl. EU L 226, S. 9, Artikel 8b, Absatz 1).
- [6] Ternes T. A. *Water Research* **32**, p. 3245–3260 (1998)

Methods



It is highly important and desirable to counter a further spread of environmental pollution through pharmaceutical compounds. However, methodological approaches to completely remove these substances from drinking water are not yet sophisticated. This study aims to verify whether an aptamer-based filter system is able to eliminate harmful traces of pharmaceuticals and other chemicals from drinking water. After the first validation of possible targets (e.g. E2) a corresponding aptamer has to be developed before the system can be validated *in situ*. As the main goal, we aim at designing an economic and efficient aptamer-based filtering system, that can be employed in wastewater treatment facilities but also at much smaller scale (f.e. domestic water systems) alike.

www.bioforscher.de



C.2 15. Nachwuchswissenschaftlerkonferenz

Potential of a novel aptamer-based filter system for endocrine disruptors and pharmaceutical drugs in drinking water

Alexander Eisold¹, Susanne Jacob¹, Carolin Pohl², Elke Boschke² and Dirk Labudde^{1*}

¹Dept. of Mathematics, Natural & Computer Sciences
Hochschule Mittweida – University of Applied Sciences
Technikumplatz 17
09648 Mittweida, Germany

²Institute of Food Technology and Bioprocess Engineering
Technical University Dresden
Bergstraße 120
01069 Dresden, Germany

aeisold@hs-mittweida.de, sjacob1@hs-mittweida.de, carolin.pohl@tu-dresden.de,
elke.boschke@tu-dresden.de, labudde@hs-mittweida.de

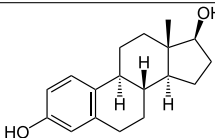
Abstract: Traces of medicinal products in ground and drinking water are known to be a growing risk for the environment. Thus, in July 2013, European Parliament took appropriate action and added three drug compounds to the supervisory list for the first time. Therefore the compounds and their effects are under observation and possibly can be further incorporated into the list of priority compounds. This includes, among others, the endogenous and female sex steroid hormone 17β -estradiol (E2). Since hormonal compounds damage the flora and fauna of water, E2 was registered on the supervisory list. Furthermore a connection is known between raised breast cancer risk for the descendant generations of rats if E2 was given during pregnancy. E2 and other chemicals are widespread in the modern livestock breeding and the effects have also been known for a long time. The trace chemicals, excreted by humans and animals, are released with waste from hospitals or pharmaceutical and chemical industry plants. Furthermore the traces continue circulating and remain in the environment.

* Author to whom correspondence should be addressed to.

1 Background

The industry of sewage treatment plants (STPs) cannot provide the removal of pharmaceutical compounds in surface and ground water. The excessive chemicals used in varying kinds of compounds and the non-removableness leads to strong concern within, for instance, the general public, industry and government [Li14]. The effects would be extensive and are also noticeable in drinking water, albeit at very low concentrations of hormones. Organic contaminants arise out of most common pharmaceuticals such as analgesics, antibiotic, cardiovascular, antiepileptic and hormonal compounds [Li14]. According to the European Parliament, there is a significant risk for aquatic environments by the medicinal products diclofenac, 17β -estradiol (E2) and ethinylestradiol (EE2). Therefore, in July 2013, it was decided to add the three drug compounds to the supervisory list for observation and possibly can be further incorporated into the list of priority compounds [Uni13]. The focus in our current work lies on the endogenous steroid hormone E2, because of its harmful effects on endocrine functions of human and aquatic organisms [HJYY11]. The different physico-chemical properties of E2 are summarized in Table 1. The greatest estrogenic activity implies negative effects, such as abnormality of function and growth of the male reproductive system, as well as a notable influence regarding the decline of male birth rate and the rise of incidence of tumors [YLG⁺12]. Furthermore by ingestion of E2 over the food chain during pregnancy, a raised breast cancer risk for the descendant generations of rats was observed [dAWC⁺12]. E2 and other chemicals are used more frequently in livestock breeding for acceleration of growth. In addition E2 and EE2 are used as hormonal contraceptives e.g. as birth control pills. Thus, these compounds find their ways into the environment and STPs through urinal or fecal excretion. Domestic sewage and wastewater from hospitals or pharmaceutical and chemical industry plants are introduced into the soil and environment. Figure 1 shows the major entry paths and their branching of minor paths of medicinal products.

Table 1: Physico-chemical properties of endogenous steroid hormone E2 containing acid dissociation constant, octanol-water partition coefficient, soil organic carbon-water partitioning coefficient and soil-water partitioning coefficient (distribution coefficient) [Li14]. The structural formula of E2 as *Natta projection* illustrates the spatial arrangement of the molecule substituents.

Compound	pK_a	$\log K_{OW}$	$\log K_{OC}$	$\log K_d$	structural formula
17β -estradiol	10.4	3.9 - 4.0	3.13 - 3.69	2.30 - 2.83	

In Europe the maximum concentration of E2 in different kinds of waters has been quantified. The occurrence in sewage of STP amounts to $9.2 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ in Sweden [ZMM09], $1.2 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ in surface water and $0.79 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ in ground water, both in Austria [HGM⁺04]. All measured values deceed the lowest predicted no effect concentration threshold of $10 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$.

The current technical capabilities of sewage purification do not allow to remove traces of medicinal products. An aptamer-based filter technology is an efficient application for the removal small molecules such as E2. Aptamers are highly specific artificial single-stranded oligonucleotides (e.g. DNA, RNA) of various length (> 50 nt) and can be used as biosensors, immunoassays, and other analytical formats [BOSS08]. Recently KIM ET AL. detected a single-stranded DNA (ssDNA) aptamer selective for E2: 5'-GCTTCCAGCTTATTGAATTACACGCAGAGGGTAGCGGCTCTGCGCATTCAATTGCTGCGCGCTGAAGCGCGGAAGC-3' [KJM⁺07]. In 2012, LANGAN ET AL. investigated the binding affinity of anti-E2 aptamer with this immobilized ssDNA aptamer and measured it using capillary electrophoresis. The results of this work demonstrate the binding capabilities of the ssDNA aptamer sequence for other steroidal compounds such as E2 and estrone [LNC⁺12].

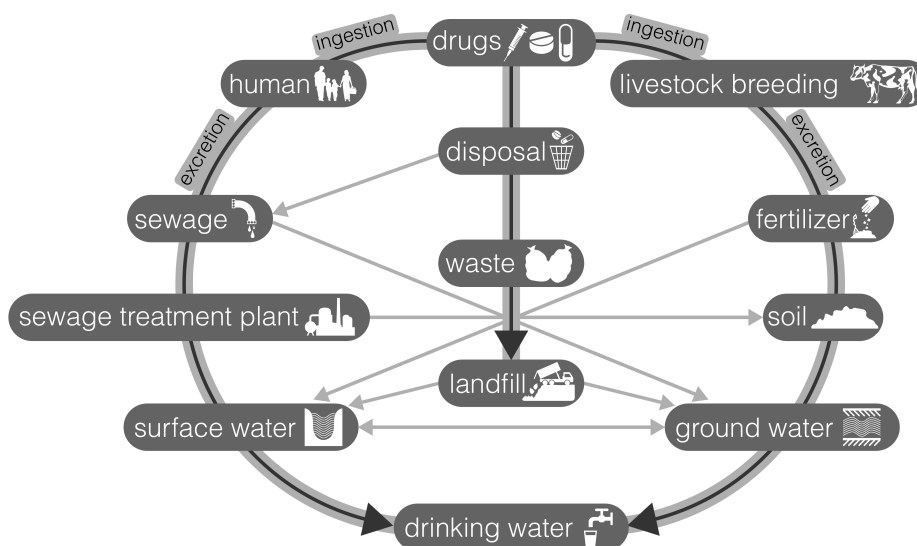


Figure 1: Schematic overview of the three major entry paths (shaded arrows) and their minor paths (non shaded arrows) of medical products in the drinking water [Ter98].

2 Methods

The aim of the project is to analyze and compare of both aptamer immobilization methods [KJM⁺07, YLG⁺12], identify the specific ligand docking site and detect an pharmacophore model for further traces of medicinal products. Firstly, the anti-E2 aptamer described above has to be immobilized with linker molecules onto the modified substrate surface. Figure 2A shows the covalent anchorage procedure of the anti-E2 aptamer. After *in vitro* validation of the binding affinity of E2 and the complex, which is composed of the modified surface and the anti-E2 aptamer, it can be applied in a filter cartridge. This

enables the *in situ* validation of the filter system. Furthermore, the docking analyses with the aid of bioinformatic knowledge are used to understand the binding affinity between E2 and the aptamer. In addition, physico-chemical properties play the key role in ligand binding and are necessary for further pharmacophore detection. The aptamer specific fold properties allow to give statements about the solvent accessible surface areas for possible points of entry. Hence, the specific modification of chemical structure of the aptamer allows new perspectives with regard to remove different pharmaceutical compounds. Figure 2B represents a possible exemplary construction of a filter cartridge with immobilized specific aptamers. After validation studies transfer this filter system into industrial scale, development of a larger scale filter system is possible.

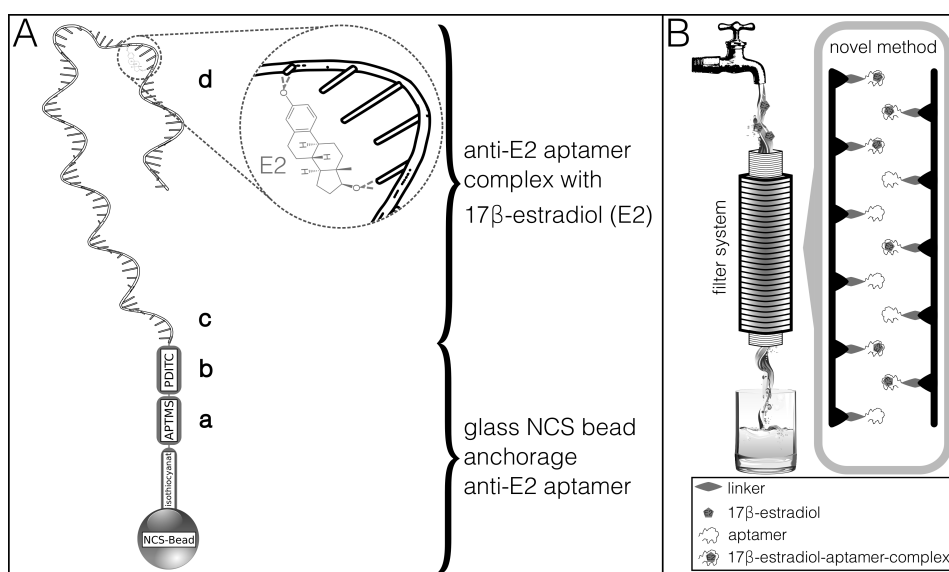


Figure 2: (A) Schematic depiction of covalent anchorage of the anti-E2 aptamer on an isothiocyanate-modified glass NCS bead (native calcium sulfate). Through modification steps the NCS bead (a) was modified with (3-aminopropyl)-trimethoxysilane (APTMS) and (b) incubated with p-phenylene diisothiocyanate (PDITC). (c) The anti-E2 aptamer is immobilized onto the surface of a NCS bead. (d) The aptamer can selectively capture E2 [HJYY11]. (B) Representation of a possible filter cartridge for the cleaning of water with traces of medicinal products. Water flows from the top of the filter system and is cleaned up through specific aptamers. These aptamers are immobilized with linker molecules (rhombus) onto the surface (e.g. modified glass beads, fiber glass or gold particles) of the filter inside and absorb the E2 molecules (pentagon).

3 Perspective , Discussion & Conclusion

The validation of a pharmacophore model for hormone molecules, which are present in surface and ground water, can be achieved by detailed consideration of physico-chemical properties. Although the endocrine effects are varied and different, the compounds share common physico-chemical properties. Hence, they are supposed to have similar binding affinity to the anti-E2 aptamer like E2. Figure 3 shows for a selection of four steroid hormones that the basic substructures are identical to substructure of E2 (see the Table 1 above).

The standard ozonization method in STPs destroys traces of medicinal products, but the effects of thereby accruing derivatives remain unknown. The novel aptamer-based removal method is a decisive advantage: pharmaceutical compounds are removed entirely from the production cycle of drinking water.

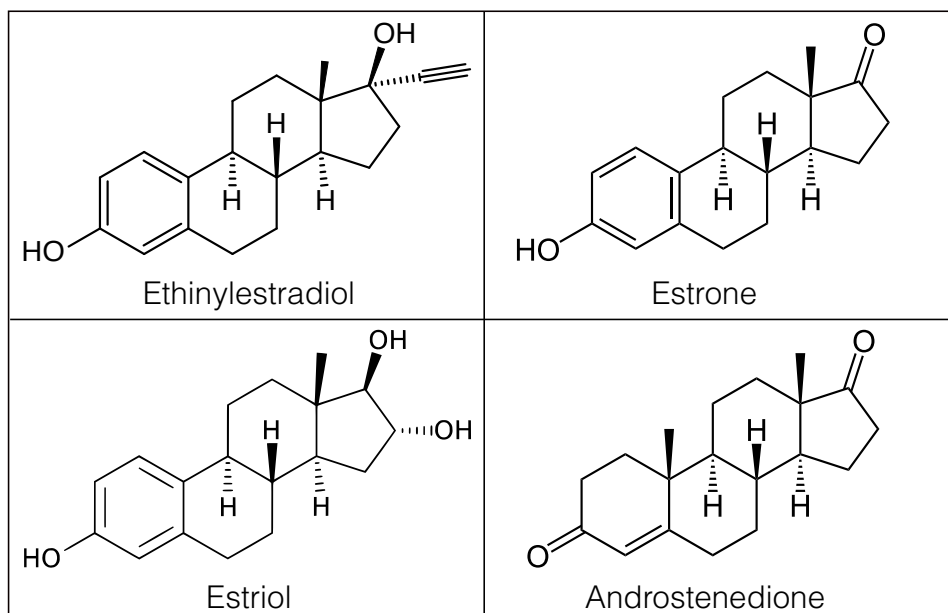


Figure 3: Overview of four different steroid hormones with same substructures: three cyclohexanes and one cyclopentane.

References

- [BOSS08] S. Balamurugan, A. Obubuafo, S. A. Soper, and D. A. Spivak. Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications. *Anal Bioanal Chem*, 390(4):1009–1021, Feb 2008.
- [dAWC⁺12] S. de Assis, A. Warri, M. I. Cruz, O. Laja, Y. Tian, B. Zhang, Y. Wang, T. H. Huang, and L. Hilakivi-Clarke. High-fat or ethinyl-oestradiol intake during pregnancy increases mammary cancer risk in several generations of offspring. *Nature Communications*, 3:1053, 2012.
- [HGM⁺04] P. Hohenblum, O. Gans, W. Moche, S. Scharf, and G. Lorbeer. Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface waters in Austria. *Sci. Total Environ.*, 333(1-3):185–193, Oct 2004.
- [HJYY11] G. D. Huy, N. Jin, B. C. Yin, and B. C. Ye. A novel separation and enrichment method of 17 β -estradiol using aptamer-anchored microbeads. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(2):189–195, Feb 2011.
- [KJM⁺07] Y. S. Kim, H. S. Jung, T. Matsuura, H. Y. Lee, T. Kawai, and M. B. Gu. Electrochemical detection of 17 β -estradiol using DNA aptamer immobilized gold electrode chip. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(11):2525–2531, May 2007.
- [Li14] W.C. Li. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution*, 187(0):193 – 201, 2014.
- [LNC⁺12] T. J. Langan, V. T. Nyakubaya, L. D. Casto, T. D. Dolan, S. A. Archer-Hartmann, S. L. Yedlapalli, L. J. Sooter, and L. A. Holland. Assessment of aptamer-steroid binding using stacking-enhanced capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 33(5):866–869, Mar 2012.
- [Ter98] Thomas A Ternes. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32(11):3245 – 3260, 1998.
- [Uni13] European Union. Water Framework Directive; Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council, Aug 2013.
- [YLG⁺12] N. Yildirim, F. Long, C. Gao, M. He, H. C. Shi, and A. Z. Gu. Aptamer-based optical biosensor for rapid and sensitive detection of 17 β -estradiol in water samples. *Environ. Sci. Technol.*, 46(6):3288–3294, Mar 2012.
- [ZMM09] S. Zorita, L. Martensson, and L. Mathiasson. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden. *Sci. Total Environ.*, 407(8):2760–2770, Apr 2009.

C.3 Review Ergebnis

Review-Ergebnis

Details zum Beitrag

Art des Beitrages / Konferenztrack: **Vortrag**


Development of a novel aptamer-based filter system for endocrine disruptors and pharmaceutical drugs in drinking water

262

Eisold, Alexander; Jacob, Susanne; Labudde, Dirk

Organisation(en): Hochschule Mittweida – University of Applied Sciences, Technikumplatz 17, 09648 Mittweida, Germany
eingereicht von: **Alexander Eisold (bioinformatics group Mittweida, DE)**, ID: 1106

Vortragender Autor: Eisold, Alexander aeisold@hs-mittweida.de

 Dieser Beitrag wurde ausschließlich durch Studenten und/oder Doktoranden erstellt.

Themen: Angewandte Naturwissenschaften

Stichworte: endocrine disruptors, drinking water, water pollution, filter, aptamer

Anmerkungen / Nachrichten

Anmerkung der Autoren:

Sehr geehrtes Programmkomitee,

könnten sie bitte den Titel unseres Beitrages Umbenennen. Es handelt sich lediglich um eine kleine Änderung:

Potential of a novel aptamer-based filter system for endocrine disruptors and pharmaceutical drugs in drinking water

Vielen Dank und freundliche Grüße,

Alexander Eisold

Begutachtungsergebnis der Experten

Der Beitrag wurde angenommen.

Nachricht des Programmkomitees an die Autoren

Vortrag

Details zur zugewiesenen Session

2-2: Vorträge: Naturwissenschaften-2

Zeit: Donnerstag, 24.04.2014: 12:00 - 13:30

Ort: H14 HS3

Übersicht der Einzelgutachten

Fragen		Gutachten 1
Inhaltliche Qualität	10%	8
Bedeutung für Theorie oder Praxis	10%	8
Originalität und Innovationsgrad	10%	8
Thematische Relevanz für den "Call for Papers"	10%	8
Qualität der Darstellung	10%	8
Gesamtempfehlung	50%	8
Gesamtpunkte (von 100)		80

Gutachten 1

Beurteilung des Beitrags

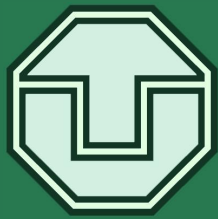
Inhaltliche Qualität 8 (10%)	Bedeutung 8 (10%)	Originalität 8 (10%)	Thematische Relevanz 8 (10%)	Darstellung 8 (10%)	Empfehlung 8 (50%)	Gesamtpunkte (von 100) 80
---	--------------------------------	-----------------------------------	---	----------------------------------	---------------------------------	-------------------------------------

Kommentare des Gutachters zum Beitrag

Kommentare für die Autoren:

Schöne Arbeit. Bitte einen deutschen Beitrag für die Konferenz einreichen.

C.4 Himmelfahrtstagung



Development of an aptamer-based procedure to remove estradiol from water supplies

C. Pohl¹, A. Eisold², S. Jacob², Th. Bley¹, D. Labudde², E. Boschke¹

¹ Institute of Food Technology and Bioprocess Engineering, Technische Universität Dresden, 01062 Dresden, Germany

² University of Applied Sciences, Hochschule Mittweida, 09648 Mittweida, Germany

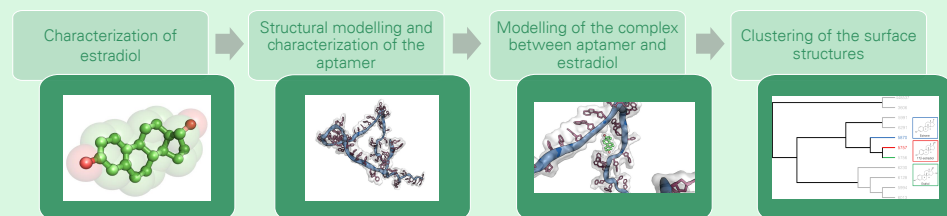
Motivation and Aims:

Endocrine-disrupting chemicals (EDC), natural or man-made, can enter environmental compartments and the hydrological cycle, thereby contaminating drinking water, food and other resources through both excretions (animal and human) and effluents of the pharmaceutical and chemical industries. These substances have harmful effects on human health and environment like abnormal growth patterns and feminization of animals. A particularly important EDC is the hormone 17 β -estradiol, thus it is essential to remove it from the environment.

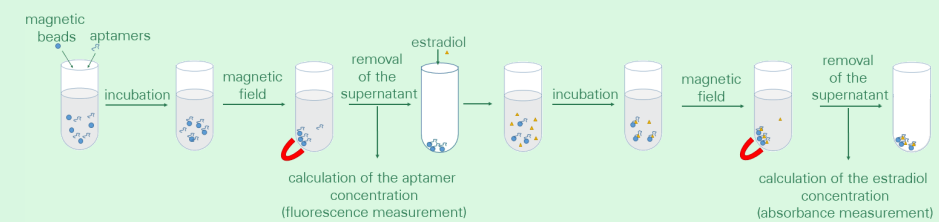
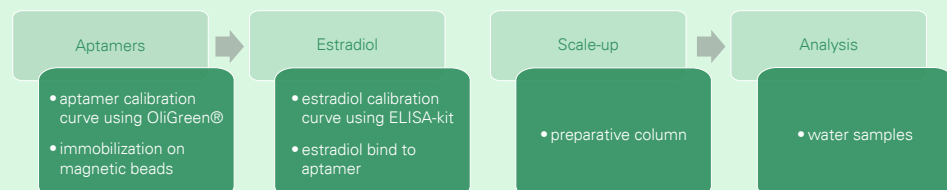
Therefore an innovative technology to remove estradiol from drinking water using immobilized aptamers that bind 17 β -estradiol is designed and validated. Based on the key-lock principle between the aptamer and the estradiol it will be possible to remove compounds without leaving traces in contrast to established cleaning methods like ozonation, carbon and sand filter as well as enzymatic cleavage.

Materials and Methods:

bioinformatic part:

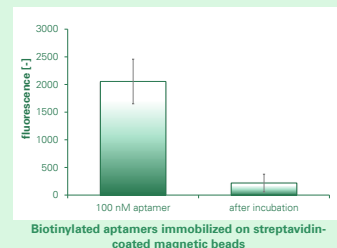


experimental part:



Principle of the removal of estradiol from water supplies using aptamer based Biomagnetic Separation

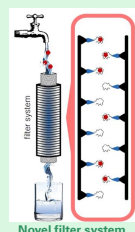
Results and future prospects:



Biotinylated aptamers immobilized on streptavidin-coated magnetic beads

In the experiments the aptamers were immobilized on magnetic beads as a solid support (see left). The verification of the binding between the 17 β -estradiol and the immobilized aptamers is in progress. Moreover a scale-up to an efficient preparative column (see right) is planned. Using this column it might be possible to filter water samples.

Further works are directed to evaluate the specificity of the binding as well as the reproducibility of experimental results and the reusability of chosen carriers.



Novel filter system

Dipl.-Ing. Carolin Pohl
fon: +49 351 / 463 32585
fax: +49 351 / 463 37761
carolin.pohl@tu-dresden.de



Cooperation partner:



Funding:



Anhang D: CD

Auf der CD befinden sich folgende Dateien:

1. Masterarbeit

a) AEisold_MO12w1M_Masterarbeit_2014.pdf

2. Abbildungen

a) Kapitel 1

b) Kapitel 2

c) Kapitel 3

d) Kapitel 4

e) Kapitel 5

f) Kapitel 6

Literaturverzeichnis

- [Ahmed, 2000] Ahmed, S. A. (2000). The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disruptors): a new emerging field. *Toxicology*, 150(1-3):191–206.
- [Amore et al., 1997] Amore, B. M., Kalthorn, T. F., Skiles, G. L., Hunter, A. P., Bennett, G. D., Finnell, R. H., Nelson, S. D., and Slattery, J. T. (1997). Characterization of carbamazepine metabolism in a mouse model of carbamazepine teratogenicity. *Drug Metab. Dispos.*, 25(8):953–962.
- [Atkinson et al., 2003] Atkinson, S., Atkinson, M. J., and Tarrant, A. M. (2003). Estrogens from sewage in coastal marine environments. *Environ. Health Perspect.*, 111(4):531–535.
- [Azzi et al., 1996] Azzi, A., Rehse, P. H., Zhu, D. W., Campbell, R. L., Labrie, F., and Lin, S. X. (1996). Crystal structure of human estrogenic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase complexed with 17 beta-estradiol. *Nat. Struct. Biol.*, 3(8):665–668.
- [Beier et al., 2014] Beier, R., Pahlke, C., Quenzel, P., Henseleit, A., Boschke, E., Cuniberti, G., and Labudde, D. (2014). Selection of a DNA aptamer against norovirus capsid protein VP1. *FEMS Microbiol. Lett.*, 351(2):162–169.
- [Bergmann et al., 2011] Bergmann, A., Fohrmann, R., and Weber, F. (2011). Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln. *Umweltbundesamt*, 66(2011):108.
- [Bernstein et al., 1977] Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer, E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T., and Tasumi, M. (1977). The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.*, 112(3):535–542.
- [Bosshard, 2001] Bosshard, H. R. (2001). Molecular recognition by induced fit: how fit is the concept? *News Physiol. Sci.*, 16:171–173.
- [Braasch and Corey, 2001] Braasch, D. A. and Corey, D. R. (2001). Synthesis, analysis, purification, and intracellular delivery of peptide nucleic acids. *Methods*, 23(2):97–107.
- [Breton et al., 1996] Breton, R., Housset, D., Mazza, C., and Fontecilla-Camps, J. C. (1996). The structure of a complex of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase

with estradiol and NADP⁺ identifies two principal targets for the design of inhibitors. *Structure*, 4(8):905–915.

[Brzozowski et al., 1997] Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. A., and Carlquist, M. (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389(6652):753–758.

[Bueno et al., 2012] Bueno, M. J., Gomez, M. J., Herrera, S., Hernando, M. D., Aguera, A., and Fernandez-Alba, A. R. (2012). Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: two years pilot survey monitoring. *Environ. Pollut.*, 164:267–273.

[Campbell and Reece, 2009] Campbell, N. and Reece, J. (2009). *Biologie*. Pearson Studium - Biologie. Pearson Deutschland.

[Case et al., 2012] Case, D. A., Babin, V., Berryman, J. T., Betz, R. M., Cai, Q., Cerutti, D. S., Cheatham, T. E., Darden, T. A., Duke, R. E., Gohlke, H., Goetz, A. W., Gusarov, S., Homeyer, N., Janowski, P., Kaus, J., Kolossváry, I., Kovalenko, A., Lee, T. S., LeGrand, S., Luchko, T., Luo, R., Madej, B., Merz, K. M., Paesani, F., Roe, D. R., Roitberg, A., Sagui, C., Salomon-Ferrer, R., Seabra, G., Simmerling, C. L. Smith, W., Swails, J., Walker, R. C. Wang, J. W. R. M., X., W., and Kollma, P. (2012). Amber 14.

[Cattani-Scholz et al., 2009] Cattani-Scholz, A., Pedone, D., Blobner, F., Abstreiter, G., Schwartz, J., Tornow, M., and Andruzzi, L. (2009). PNA-PEG modified silicon platforms as functional bio-interfaces for applications in DNA microarrays and biosensors. *Biomacromolecules*, 10(3):489–496.

[Célia et al., 2000] Célia, F. G., Bickelhaupt, F. M., Snijders, J. G., and Baerends, E. J. (2000). Hydrogen bonding in dna base pairs: reconciliation of theory and experiment. *Journal of the American Chemical Society*, 122(17):4117–4128.

[Changeux and Edelstein, 2011] Changeux, J. P. and Edelstein, S. (2011). Conformational selection or induced fit? 50 years of debate resolved. *F1000 Biol Rep*, 3:19.

[Cicek et al., 1998] Cicek, N., Winnen, H., Suidan, M. T., Wrenn, B. E., V., U., and Manem, J. (1998). Effectiveness of the membrane bioreactor in the biodegradation of high molecular weight compounds. *Water Research*, 32(5):1553 – 1563.

[Coe et al., 2010] Coe, T. S., Söffker, M. K., Filby, A. L., Hodgson, D., and Tyler, C. R. (2010). Impacts of early life exposure to estrogen on subsequent breeding behavior and reproductive success in zebrafish. *Environmental science & technology*, 44(16):6481–6487.

- [Cornwell et al., 2004] Cornwell, T., Cohick, W., and Raskin, I. (2004). Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*, 65(8):995–1016.
- [Csermely et al., 2010] Csermely, P., Palotai, R., and Nussinov, R. (2010). Induced fit, conformational selection and independent dynamic segments: an extended view of binding events. *Trends Biochem. Sci.*, 35(10):539–546.
- [de Assis et al., 2012] de Assis, S., Warri, A., Cruz, M. I., Laja, O., Tian, Y., Zhang, B., Wang, Y., Huang, T. H., and Hilakivi-Clarke, L. (2012). High-fat or ethinyl-oestradiol intake during pregnancy increases mammary cancer risk in several generations of offspring. *Nat Commun*, 3:1053.
- [Delbes et al., 2006] Delbes, G., Levacher, C., and Habert, R. (2006). Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. *Reproduction*, 132(4):527–538.
- [Delfosse et al., 2012] Delfosse, V., Grimaldi, M., Pons, J. L., Boulahtouf, A., le Maire, A., Cavailles, V., Labesse, G., Bourguet, W., and Balaguer, P. (2012). Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109(37):14930–14935.
- [Demidov et al., 1994] Demidov, V. V., Potaman, V. N., Frank-Kamenetskii, M. D., Egholm, M., Buchard, O., Sonnichsen, S. H., and Nielsen, P. E. (1994). Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem. Pharmacol.*, 48(6):1310–1313.
- [Demidov et al., 1995] Demidov, V. V., Yavnilovich, M. V., Belotserkovskii, B. P., Frank-Kamenetskii, M. D., and Nielsen, P. E. (1995). Kinetics and mechanism of polyamide (peptide) nucleic acid binding to duplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92(7):2637–2641.
- [Dieckmann et al., 1996] Dieckmann, T., Suzuki, E., Nakamura, G. K., and Feigon, J. (1996). Solution structure of an ATP-binding RNA aptamer reveals a novel fold. *RNA*, 2(7):628–640.
- [Dupradeau et al., 2008] Dupradeau, F. Y., Cezard, C., Lelong, R., Stanislawiak, E., Pecher, J., Delepine, J. C., and Cieplak, P. (2008). R.E.D.D.B.: a database for RESP and ESP atomic charges, and force field libraries. *Nucleic Acids Res.*, 36(Database issue):D360–367.
- [Eiler et al., 2001] Eiler, S., Gangloff, M., Duclaud, S., Moras, D., and Ruff, M. (2001). Overexpression, purification, and crystal structure of native ER alpha LBD. *Protein Expr. Purif.*, 22(2):165–173.

- [Ellington and Szostak, 1990] Ellington, A. D. and Szostak, J. W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287):818–822.
- [European Union, 2013] European Union (2013). Water Framework Directive. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, page 75.
- [Famulok, 1999] Famulok, M. (1999). Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9(3):324–329.
- [Fuchs et al., 2013] Fuchs, S., Nguyen, H. D., Phan, T. T., Burton, M. F., Nieto, L., de Vries-van Leeuwen, I. J., Schmidt, A., Goodarzifard, M., Agten, S. M., Rose, R., Ottmann, C., Milroy, L. G., and Brunsveld, L. (2013). Proline primed helix length as a modulator of the nuclear receptor-coactivator interaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 135(11):4364–4371.
- [Fukuhara et al., 2006] Fukuhara, T., Iwasaki, S., Kawashima, M., Shinohara, O., and Abe, I. (2006). Absorbability of estrone and 17 β -estradiol in water onto activated carbon. *Water Res.*, 40(2):241–248.
- [Gamage et al., 2005] Gamage, N. U., Tsvetanov, S., Duggleby, R. G., McManus, M. E., and Martin, J. L. (2005). The structure of human SULT1A1 crystallized with estradiol. An insight into active site plasticity and substrate inhibition with multi-ring substrates. *J. Biol. Chem.*, 280(50):41482–41486.
- [Gangloff et al., 2001] Gangloff, M., Ruff, M., Eiler, S., Duclaud, S., Wurtz, J. M., and Moras, D. (2001). Crystal structure of a mutant hER α ligand-binding domain reveals key structural features for the mechanism of partial agonism. *J. Biol. Chem.*, 276(18):15059–15065.
- [Gassler et al., 2000] Gassler, N., Peuschel, T., and Pankau, R. (2000). Pediatric reference values of estradiol, testosterone, lutropin, follitropin and prolactin. *Clin. Lab.*, 46(11-12):553–560.
- [Gomes et al., 2004] Gomes, R. L., Deacon, H. E., Lai, K. M., Birkett, J. W., Scrimshaw, M. D., and Lester, J. N. (2004). An assessment of the bioaccumulation of estrone in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23(1):105–108.
- [Gosavi et al., 2013] Gosavi, R. A., Knudsen, G. A., Birnbaum, L. S., and Pedersen, L. C. (2013). Mimicking of estradiol binding by flame retardants and their metabolites: a crystallographic analysis. *Environ. Health Perspect.*, 121(10):1194–1199.
- [Gressner et al., 2007] Gressner, A., Baum, H., and Arndt, T. (2007). *Springer Lexikon*

Klinische Chemie: Medizinische Labordiagnostik von A bis Z. Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer.

- [Grishkovskaya et al., 2002] Grishkovskaya, I., Avvakumov, G. V., Hammond, G. L., Catalano, M. G., and Muller, Y. A. (2002). Steroid ligands bind human sex hormone-binding globulin in specific orientations and produce distinct changes in protein conformation. *J. Biol. Chem.*, 277(35):32086–32093.
- [Gu and Kim, 2014] Gu, M. and Kim, H. (2014). *Biosensors Based on Aptamers and Enzymes*. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Springer Berlin Heidelberg.
- [Götz, 2012] Götz, C. A. (2012). Mikroverunreinigungen aus Nutztierhaltung. *Aqua & Gas - Fachzeitschrift für Gas, Wasser und Abwasser*, 11(2012):8.
- [Hamid and Eskicioglu, 2012] Hamid, H. and Eskicioglu, C. (2012). Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Res.*, 46(18):5813–5833.
- [Hembrock-Heger, 2007] Hembrock-Heger, A. (2007). Eintrag von Arzneimitteln und deren Verhalten und Verbleib in der Umwelt. *Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen*, 2(1):1–358.
- [Hermann and Patel, 2000] Hermann, T. and Patel, D. J. (2000). Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science*, 287(5454):820–825.
- [Hoigné and Bader, 1983] Hoigné, J. and Bader, H. (1983). Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water—i: non-dissociating organic compounds. *Water Research*, 17(2):173–183.
- [Hoogsteen, 1963] Hoogsteen, K. (1963). The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Crystallographica*, 16(9):907–916.
- [Huang et al., 2001] Huang, C., Renew, J. E., Smeby, K. L., Pinkston, K., and Sedlak, D. L. (2001). Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis. *Water Resour.*, 120:30–40.
- [Huy et al., 2011] Huy, G. D., Jin, N., Yin, B. C., and Ye, B. C. (2011). A novel separation and enrichment method of 17 β -estradiol using aptamer-anchored microbeads. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(2):189–195.
- [Irmak et al., 2005] Irmak, S., Erbatur, O., and Akgerman, A. (2005). Degradation of

- 17beta-estradiol and bisphenol A in aqueous medium by using ozone and ozone/UV techniques. *J. Hazard. Mater.*, 126(1-3):54–62.
- [Irwin et al., 2001] Irwin, L. K., Gray, S., and Oberdorster, E. (2001). Vitellogenin induction in painted turtle, *Chrysemys picta*, as a biomarker of exposure to environmental levels of estradiol. *Aquat. Toxicol.*, 55(1-2):49–60.
- [Jenison et al., 1994] Jenison, R. D., Gill, S. C., Pardi, A., and Polisky, B. (1994). High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*, 263(5152):1425–1429.
- [Jiang et al., 2005] Jiang, J. Q., Yin, Q., Zhou, J. L., and Pearce, P. (2005). Occurrence and treatment trials of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in wastewaters. *Chemosphere*, 61(4):544–550.
- [Jobling et al., 1995] Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M. G., and Sumpter, J. P. (1995). A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.*, 103(6):582–587.
- [Johnson et al., 2000] Johnson, A. C., Belfroid, A., and Di Corcia, A. D. (2000). Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci. Total Environ.*, 256(2-3):163–173.
- [Kakuta et al., 1997] Kakuta, Y., Pedersen, L. G., Carter, C. W., Negishi, M., and Pedersen, L. C. (1997). Crystal structure of estrogen sulphotransferase. *Nat. Struct. Biol.*, 4(11):904–908.
- [Kawasaki et al., 2009] Kawasaki, N., Ogata, F., Yamaguchi, I., and Tominaga, H. (2009). Degradation characteristics of 17beta-estradiol by ozone treatment with activated carbon. *J Oleo Sci*, 58(5):261–266.
- [Kidd et al., 2007] Kidd, K. A., Blanchfield, P. J., Mills, K. H., Palace, V. P., Evans, R. E., Lazorchak, J. M., and Flick, R. W. (2007). Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(21).
- [Kim, 2013] Kim, S. (2013). Nucleic acid aptamer which specifically binds to bisphenol a. US Patent 8,410,256.
- [Kim et al., 2007] Kim, Y. S., Jung, H. S., Matsuura, T., Lee, H. Y., Kawai, T., and Gu, M. B. (2007). Electrochemical detection of 17beta-estradiol using DNA aptamer immobilized gold electrode chip. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(11):2525–2531.
- [Kleine and Rossmannith, 2013] Kleine, B. and Rossmannith, W. (2013). *Hormone und Hormonsystem - Lehrbuch der Endokrinologie*. Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg.

- [Klug and Famulok, 1994] Klug, S. J. and Famulok, M. (1994). All you wanted to know about SELEX. *Mol. Biol. Rep.*, 20(2):97–107.
- [Koh et al., 2008] Koh, Y. K., Chiu, T. Y., Boobis, A., Cartmell, E., Scrimshaw, M. D., and Lester, J. N. (2008). Treatment and removal strategies for estrogens from wastewater. *Environ Technol*, 29(3):245–267.
- [Koide et al., 2002] Koide, A., Abbatiello, S., Rothgery, L., and Koide, S. (2002). Probing protein conformational changes in living cells by using designer binding proteins: application to the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(3):1253–1258.
- [Korner et al., 2001] Korner, W., Spengler, P., Bolz, U., Schuller, W., Hanf, V., and Metzger, J. W. (2001). Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 2. Biological analysis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(10):2142–2151.
- [Koshland, 1958] Koshland, D. E. (1958). Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 44(2):98–104.
- [Lai et al., 2002] Lai, K. M., Scrimshaw, M. D., and Lester, J. N. (2002). Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by *Chlorella vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(2):859–864.
- [Lamminmaki and Kankare, 2001] Lamminmaki, U. and Kankare, J. A. (2001). Crystal structure of a recombinant anti-estradiol Fab fragment in complex with 17 β -estradiol. *J. Biol. Chem.*, 276(39):36687–36694.
- [Lapworth et al., 2012] Lapworth, D. J., Baran, N., Stuart, M. E., and Ward, R. S. (2012). Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environ. Pollut.*, 163:287–303.
- [Lauhon and Szostak, 1995] Lauhon, C. T. and Szostak, J. W. (1995). RNA aptamers that bind flavin and nicotinamide redox cofactors. *J. Am. Chem. Soc.*, 117(4):1246–1257.
- [Leduc et al., 2003] Leduc, A. M., Trent, J. O., Wittliff, J. L., Bramlett, K. S., Briggs, S. L., Chirgadze, N. Y., Wang, Y., Burris, T. P., and Spatola, A. F. (2003). Helix-stabilized cyclic peptides as selective inhibitors of steroid receptor-coactivator interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(20):11273–11278.
- [Lee et al., 2010] Lee, J. H., Yigit, M. V., Mazumdar, D., and Lu, Y. (2010). Molecular diagnostic and drug delivery agents based on aptamer-nanomaterial conjugates. *Advanced drug delivery reviews*, 62(6):592–605.

- [Leidenberger et al., 2009] Leidenberger, F., Strowitzki, T., and Ortmann, O. (2009). Springer.
- [Li, 2014] Li, W. C. (2014). Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environ. Pollut.*, 187:193–201.
- [Lin and Patei, 1997] Lin, C. H. and Patei, D. J. (1997). Structural basis of dna folding and recognition in an amp-dna aptamer complex: distinct architectures but common recognition motifs for dna and rna aptamers complexed to amp. *Chemistry & biology*, 4(11):817–832.
- [Lin et al., 2012] Lin, P. H., Tsai, C. W., Wu, J. W., Ruaan, R. C., and Chen, W. Y. (2012). Molecular dynamics simulation of the induced-fit binding process of DNA aptamer and L-argininamide. *Biotechnol J*, 7(11):1367–1375.
- [Lin et al., 1996] Lin, Y., Nieuwlandt, D., Magallanez, A., Feistner, B., and Jayasena, S. D. (1996). High-affinity and specific recognition of human thyroid stimulating hormone (hTSH) by in vitro-selected 2'-amino-modified RNA. *Nucleic Acids Res.*, 24(17):3407–3414.
- [Lopez, 2010] Lopez, J. (2010). Endocrine-disrupting chemical pollution: why the epa should regulate these chemicals under the clean water act. *Sustainable Development Law & Policy*, 10(3):7.
- [Lüllmann et al., 2006] Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L., Kuschinsky, G., and Hammelehle, R. (2006). *Pharmakologie und Toxikologie - Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen ; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker ; 129 Tabellen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 16. vollst. überarb. aufl. edition.
- [Lüllmann et al., 2009] Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L., Kuschinsky, G., and Hammelehle, R. (2009). *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie : Begründet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel*. Urban & Fischer Verlag in Elsevier GmbH, 10. überarb. aufl. edition.
- [Mai et al., 2008] Mai, J., Sun, W., Xiong, L., Liu, Y., and Ni, J. (2008). Titanium dioxide mediated photocatalytic degradation of 17beta-estradiol in aqueous solution. *Chemosphere*, 73(4):600–606.
- [Maniero et al., 2008] Maniero, M. G., Bila, D. M., and Dezotti, M. (2008). Degradation and estrogenic activity removal of 17beta-estradiol and 17alpha-ethinylestradiol by ozonation and O₃/H₂O₂. *Sci. Total Environ.*, 407(1):105–115.

- [Masuko, 2003] Masuko, M. (2003). Hybridization of an immobilized PNA probe with its complementary oligodeoxyribonucleotide on the surface of silica glass. *Nucleic Acids Res. Suppl.*, (3):145–146.
- [Mazza et al., 1998] Mazza, C., Breton, R., Housset, D., and Fontecilla-Camps, J. C. (1998). Unusual charge stabilization of NADP⁺ in 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 273(14):8145–8152.
- [McGaughey et al., 1998] McGaughey, G. B., Gagne, M., and Rappe, A. K. (1998). π -Stacking interactions. Alive and well in proteins. *J. Biol. Chem.*, 273(25):15458–15463.
- [McLachlan et al., 2006] McLachlan, J. A., Simpson, E., and Martin, M. (2006). Endocrine disruptors and female reproductive health. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 20(1):63–75.
- [Mocklinghoff et al., 2010] Mocklinghoff, S., Rose, R., Carraz, M., Visser, A., Ottmann, C., and Brunsveld, L. (2010). Synthesis and crystal structure of a phosphorylated estrogen receptor ligand binding domain. *Chembiochem*, 11(16):2251–2254.
- [Mohagheghian et al., 2014] Mohagheghian, A., Nabizadeh, R., Mesdghinia, A., Rastkari, N., Mahvi, A. H., Alimohammadi, M., Yunesian, M., Ahmadkhaniha, R., and Nazmara, S. (2014). Distribution of estrogenic steroids in municipal wastewater treatment plants in Tehran, Iran. *J Environ Health Sci Eng*, 12:97.
- [Monnet et al., 2002] Monnet, C., Bettsworth, F., Stura, E. A., Le Du, M. H., Menez, R., Derrien, L., Zinn-Justin, S., Gilquin, B., Sibai, G., Battail-Poirot, N., Jolivet, M., Menez, A., Arnaud, M., Ducancel, F., and Charbonnier, J. B. (2002). Highly specific anti-estradiol antibodies: structural characterisation and binding diversity. *J. Mol. Biol.*, 315(4):699–712.
- [Munk, 2010] Munk, K. (2010). *Taschenlehrbuch Biologie: Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Aufl. edition.
- [Nicholas-Bateman, 2012] Nicholas-Bateman, D. (2012). Non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Medicine*, 40:140.
- [Nielsen, 2009] Nielsen, P. E. (2009). Self-assembling, dynamic alphaPNAs. *Chem. Biol.*, 16(7):689–690.
- [Nielsen and Appella, 2013] Nielsen, P. E. and Appella, D. H. (2013). *Peptide Nucleic Acids - Methods and Protocols*. 2. Aufl. edition.
- [Nielsen et al., 1991] Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H., and Buchardt, O. (1991).

Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, 254(5037):1497–1500.

- [Ouellette et al., 2013] Ouellette, J., dos Santos, S. C. C., Lepine, F., Juteau, P., Deziel, E., and Villemur, R. (2013). High absorption of endocrine disruptors by hytrel: towards the development of a two-phase partitioning bioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 88(1):119–125.
- [Panter et al., 1998] Panter, G., Thompson, R., and Sumpter, J. (1998). Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquatic Toxicology*, 42(4):243–253.
- [Phillips et al., 2011] Phillips, C., Roberts, L. R., Schade, M., Bazin, R., Bent, A., Davies, N. L., Moore, R., Pannifer, A. D., Pickford, A. R., Prior, S. H., Read, C. M., Scott, A., Brown, D. G., Xu, B., and Irving, S. L. (2011). Design and structure of stapled peptides binding to estrogen receptors. *J. Am. Chem. Soc.*, 133(25):9696–9699.
- [Powell et al., 2000] Powell, A. J., Read, J. A., Banfield, M. J., Gunn-Moore, F., Yan, S. D., Lustbader, J., Stern, A. R., Stern, D. M., and Brady, R. L. (2000). Recognition of structurally diverse substrates by type II 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADH II)/amyloid-beta binding alcohol dehydrogenase (ABAD). *J. Mol. Biol.*, 303(2):311–327.
- [Prlic et al., 2012] Prlic, A., Yates, A., Bliven, S. E., Rose, P. W., Jacobsen, J., Troshin, P. V., Chapman, M., Gao, J., Koh, C. H., Foisy, S., Holland, R., Rimsa, G., Heuer, M. L., Brandstatter-Muller, H., Bourne, P. E., and Willis, S. (2012). BioJava: an open-source framework for bioinformatics in 2012. *Bioinformatics*, 28(20):2693–2695.
- [Pronk et al., 2013] Pronk, S., Pall, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M. R., Smith, J. C., Kasson, P. M., van der Spoel, D., Hess, B., and Lindahl, E. (2013). GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, 29(7):845–854.
- [Qiang et al., 2013] Qiang, Z., Nie, Y., Ben, W., Qu, J., and Zhang, H. (2013). Degradation of endocrine-disrupting chemicals during activated sludge reduction by ozone. *Chemosphere*, 91(3):366–373.
- [Ray and Norden, 2000] Ray, A. and Norden, B. (2000). Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *FASEB J.*, 14(9):1041–1060.
- [Sakamoto et al., 2005] Sakamoto, T., Oguro, A., Kawai, G., Ohtsu, T., and Nakamura,

- Y. (2005). NMR structures of double loops of an RNA aptamer against mammalian initiation factor 4A. *Nucleic Acids Res.*, 33(2):745–754.
- [Sarmah et al., 2006] Sarmah, A. K., Meyer, M. T., and Boxall, A. B. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5):725–759.
- [Sen and Nilsson, 1998] Sen, S. and Nilsson, L. (1998). Molecular dynamics of duplex systems involving pna: structural and dynamical consequences of the nucleic acid backbone. *Journal of the American Chemical Society*, 120(4):619–631.
- [Servos et al., 2005] Servos, M. R., Bennie, D. T., Burnison, B. K., Jurkovic, A., McInnis, R., Neheli, T., Schnell, A., Seto, P., Smyth, S. A., and Ternes, T. A. (2005). Distribution of estrogens, 17beta-estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.*, 336(1-3):155–170.
- [Song et al., 2008] Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C., and Zhao, J. (2008). Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(2):108–117.
- [Sosniak et al., 2009] Sosniak, A. M., Gasser, G., and Metzler-Nolte, N. (2009). Thermal melting studies of alkyne- and ferrocene-containing PNA bioconjugates. *Org. Biomol. Chem.*, 7(23):4992–5000.
- [Spengler et al., 2001] Spengler, P., Korner, W., and Metzger, J. W. (2001). Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical analysis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(10):2133–2141.
- [Stierand et al., 2006] Stierand, K., Maass, P. C., and Rarey, M. (2006). Molecular complexes at a glance: automated generation of two-dimensional complex diagrams. *Bioinformatics*, 22(14):1710–1716.
- [Strehlitz et al., 2012] Strehlitz, B., Reinemann, C., Linkorn, S., and Stoltenburg, R. (2012). Aptamers for pharmaceuticals and their application in environmental analytics. *Bioanal Rev*, 4(1):1–30.
- [Tanenbaum et al., 1998] Tanenbaum, D. M., Wang, Y., Williams, S. P., and Sigler, P. B. (1998). Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(11):5998–6003.
- [Ternes, 1998] Ternes, T. A. (1998). Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 32(11):3245 – 3260.
- [Ternes et al., 1999] Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R. D., and Servos, M. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage

- treatment plants—I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.*, 225(1-2):81–90.
- [Thomson et al., 1995] Thomson, S. A., Josey, J. A., Cadilla, R., Gaul, M. D., Fred Hassman, C., Luzzio, M. J., Pipe, A. J., Reed, K. L., Ricca, D. J., Wiethe, R. W., et al. (1995). Fmoc mediated synthesis of peptide nucleic acids. *Tetrahedron*, 51(22):6179–6194.
- [Thorsell et al., 2011] Thorsell, A. G., Lee, W. H., Persson, C., Siponen, M. I., Nilsson, M., Busam, R. D., Kotenyova, T., Schuler, H., and Lehtio, L. (2011). Comparative structural analysis of lipid binding START domains. *PLoS ONE*, 6(6):e19521.
- [Tuerk and Gold, 1990] Tuerk, C. and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249(4968):505–510.
- [Ura et al., 2009] Ura, Y., Beierle, J. M., Leman, L. J., Orgel, L. E., and Ghadiri, M. R. (2009). Self-assembling sequence-adaptive peptide nucleic acids. *Science*, 325(5936):73–77.
- [Urmenyi et al., 2005] Urmenyi, A., Poot, A., Wessling, M., and Mulder, M. (2005). Affinity membranes for hormone removal from aqueous solutions. *Journal of Membrane Science*, 259(1–2):91 – 102.
- [Wallace and Schroeder, 1998] Wallace, S. T. and Schroeder, R. (1998). In vitro selection and characterization of streptomycin-binding RNAs: recognition discrimination between antibiotics. *RNA*, 4(1):112–123.
- [Warnmark et al., 2002] Warnmark, A., Treuter, E., Gustafsson, J. A., Hubbard, R. E., Brzozowski, A. M., and Pike, A. C. (2002). Interaction of transcriptional intermediary factor 2 nuclear receptor box peptides with the coactivator binding site of estrogen receptor alpha. *J. Biol. Chem.*, 277(24):21862–21868.
- [Westheimer, 1987] Westheimer, F. H. (1987). Why nature chose phosphates. *Science*, 235(4793):1173–1178.
- [World Health Organization, 2014] World Health Organization (2014). WHO - Progress on Drinking Water and Sanitation. *World Health Organization and UNICEF*, 1(1):75.
- [Yeh et al., 2010] Yeh, J. I., Pohl, E., Truan, D., He, W., Sheldrick, G. M., Du, S., and Achim, C. (2010). The crystal structure of non-modified and bipyridine-modified PNA duplexes. *Chemistry*, 16(39):11867–11875.
- [Yin et al., 2002] Yin, G. G., Kookana, R. S., and Ru, Y. J. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ Int*, 28(6):545–551.

- [Ying et al., 2002] Ying, G.-G., Kookana, R. S., and Ru, Y.-J. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment international*, 28(6):545–551.
- [Zeng et al., 2013] Zeng, Q., Li, Y., and Yang, S. (2013). Sludge Retention Time as a Suitable Operational Parameter to Remove Both Estrogen and Nutrients in an Anaerobic-Anoxic-Aerobic Activated Sludge System. *Environ. Eng. Sci.*, 30(4):161–169.
- [Zhang et al., 2008] Zhang, Y., Geissen, S. U., and Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73(8):1151–1161.
- [Zuker, 2003] Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, 31(13):3406–3415.

Glossar

Adrenalin (Epinephrin) ist ein wasserlösliches Aminhormon (Tyrosinderivat) und gehört zur Gruppe der Katecholamine. Beschleunigende Wirkung auf Herzfrequenz und führt zu Verengung von Blutkapillaren.

Aminosäuren Klasse organischer Verbindungen, die mindestens eine Carboxylgruppe (-COOH) sowie Aminogruppe (-NH₂) enthalten.

Antikörper sind globuläre Proteine mit β -Faltblattstrukturen, durch variable Domänen können diese Antigene binden. Antikörper setzen sich aus kurzen L-Ketten und langen H-Ketten zusammen, die über Disulfidbrücken mit einander verbunden sind.

Aptamer sind kurze (<80 Basen) einzelsträngige Oligonukleotide (ssDNA, RNA, PNA) und können spezifisch synthetisiert werden.

Basalmembran ist die Grenzfläche (1 μ m dick) zw. Epithelien und Bindegewebe, diese besteht größtenteils aus Kollagen, Glykoprotein und Proteoglykanen.

Basen (Nukleobasen) sind die Bausteine der DNA und RNA und für die Ausbildung der Basenpaarung verantwortlich. Die vier DNA-Basen bestehen aus Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin, bei den RNA-Basen ist Uracil anstatt Thymin vertreten.

Biosynthese ist in der Biochemie der Aufbau komplexer organischer Substanzen. Zu diesen zählen u.a. Hormone, Proteine, Aminosäuren, Nukleinsäuren Kohlenhydrate sowie Fette.

CPV-Code (dt. Gemeinsames Vokabular für öffentliche Aufträge) ist eine Nomenklatur, die ein einheitliches Klassifikationssystem für das öffentliche Beschaffungswesen vereinheitlicht.

Cytoskelett umfasst Mikrotubulin, Mikrofilamente und Intermediär Filamente und haben u. a. die Aufgaben: Formgebung, innere Festigung, intrazellulärer Transport sowie Beteiligung an der Zellteilung. Ausschließlich Eukaryotenzellen haben ein Cytoskelett.

Dopamin ist als Neurotransmitter und Hormon aktiv, ein Zwischenprodukt bei der Noradrenalin/Adrenalinbiosynthese und gehört zur Gruppe der Katecholamine. Inhibitorische Wirkung auf die Prolaktinausschüttung in der Hypophyse.

endokrine Disruptoren sind Chemikalien, die das endokrine System (Hormonsystem) des Körpers beeinflussen und störend auf das Endokrinium von Mensch und Tier wirken.

Endokrines System Teil des Organsystems bei Säugern und ist für die Regulation des physiologischen Gleichgewichts zuständig. Zu den Hauptkomponenten zählen Schilddrüse, Pankreas, Nebennieren, Hypophyse und andere Hormondrüsen.

Feminisierung ist die Ausprägung weiblicher Merkmale hervorgerufen durch Hormone.

Follikel (Primär- und Sekundärfollikel) beschreibt das histologische Aussehen des Follikelepithels (Granulosazellen im Eierstock).

Genexpression ist die Umsetzung der genetischen Information in Ribonukleinsäure und Proteine.

Glucuronsäure (Glucuronat) ist Bestandteil der Glycosaminoglycanen und die obligate Vorstufe für die Synthese konjugierter Glucuronide. Es erhöht die Wasserlöslichkeit von Eigen- und Fremdmoleküle, damit diese besser ausscheidet werden.

Gonadotropine sind komplexe Proteohormonen, die die Funktion der Ovarien steuern und Keimdrüsen stimulieren.

Granulosazellschicht sind Epithel-Zellen in Ovarialfollikeln.

Heparin-Plasma ist Blutplasma, dass frei von Zellen (Erythrozyten, Leukozyten) ist, jedoch noch Zellbestandteile (Thrombozyten) enthalten kann. Heparin ist ein Zusatz (Natrium-, Lithium- oder Ammoniumheparinat), welches die Enzymaktivität bei der Blutgerinnung hemmt.

Homöostase Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtszustandes (engl. steady state) eines offenen dynamischen Systems durch einen internen regelnden Prozess.

Hypophyse (Hirnhautdrüse) ist unterhalb des Hypothalamus und übernimmt wichtige Regulationen der Hormonsystems.

immunogen wird ein Antigen bezeichnet, welches nicht in der Lage ist eine Immunreaktion auszulösen.

Induced-Fit ist ein erweitertes Schlüssel-Schloss-Modell, welches die Ligand induzierte Konformationsänderung des Zieltargets beschreibt.

in silico sind organischer Vorgänge u.a. Prozesse, die im Computer simuliert werden (nicht im Reagenzglas oder lebenden Organismus).

in vitro sind organischer Vorgänge u.a. Prozesse, der im Reagenzglas stattfinden (außerhalb eines lebenden Organismus).

in vivo sind organischer Vorgänge u.a. Prozesse, die im lebenden Organismus stattfinden (Gegenteil von *in vitro*).

Konjugat ist ein Produkt aus mindestens zwei kovalent gebundenen Molekülen.

Kreislaufsystem Teil des Organsystems bei Säugern und ist für die Verteilung von Stoffen im Körper zuständig. Zu den Hauptkomponenten zählen Herz, Blut und Blutgefäße.

Mamma (Milchdrüsen) sind die weiblichen Brustdrüsen.

Melatonin ist ein Hormon und Mediator des Nervensystems, das in die Etablierung des Schlaf-Wach-Rhythmus von zentraler Bedeutung ist..

Metabolit Ein Metabolit ist jede in Folge von Stoffwechsel oder einer Stoffwechselreaktion produzierte chemische Zusammensetzung.

Mitochondrien sind 1-2 μm große Zellorganelle in eukaryotischen Zellen, deren Hauptaufgabe die Synthese von Adenosintriphosphat ist.

Molekulardynamik sind molekulare Modellierungen, die Computergestützt simuliert werden, dabei werden jegliche Bewegungen und Interaktionen von Atomen sowie Molekülen berechnet.

Noradrenalin (Norepinephrin) ist ein Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems, ein Zwischenprodukt bei der Adrenalinbiosynthese und gehört zur Gruppe der Katecholamine.

Nukleasen Enzymklassen, die Nukleinsäure spalten.

Oligonukleotide sind bis zu 30 aneinander geknüpfte Mononukleotide.

Ovar (Eierstock) ist ein weibliches inneres Geschlechtsorgan, in dem die weiblichen Geschlechtshormone Östrogen und Progesteron produziert werden.

Pharmakokinetik Beschreibt das Verhalten von Medikamenten im Körper über einen Zeitraum einschließlich der Prozesse der Absorption, Verteilung, Lokalisierung in Geweben, Biotransformation und Ausscheidung.

Plasmamembran (Zellmembran) ist eine Lipiddoppelschicht, die das intrazelluläre Milieu umgibt sowie den Stofftransport reguliert.

Proteasen Enzymklassen, die Proteine und Peptide spalten.

Protein-Datenbank Proteinstruktur-Datenbank besteht aus Datensätzen zur Beschreibung der dreidimensionalen Struktur von Makromolekülen, welche mittels Röntgenkristallographie oder Kernspinresonanzspektroskopie-Daten (NMR) abgeleitet sind. Wurde vom Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) übernommen.

reprotoxische Effekte Auch teratogen Effekte, sind Konsequenzen, die bei der Aufnahme schädlicher Substanzen, wie Alkohol, während der Fötusentwicklung konsumiert werden. Auswirkungen können sich als Wachstumsdefizit und geistige Behinderung äußern.

Rezeptor ist ein Signalmolekül bindendes Protein oder Proteinkomplex, welches eine Signaltransduktion hervorruft.

Schwefelsäure (Dihydrogensulfat) ist eine starke anorganische Säure. Es ist ein Substrat für Enzyme, die am Steroidhormon-Metabolismus beteiligt sind.

Serotonin ist ein Neurotransmitter und Mediator des Nervensystems, der am Schlaf-Wach-Rhythmus sowie am physiologischen Prozess der Blutgerinnung beteiligt ist. Wichtiges Nebenprodukt bei der Melatoninsynthese.

Squalen ist ein ungesättigtes Triterpen und die obligate Vorstufe bei der Synthese von Cholesterin.

Tanner-Stadien sind die fünf physischen Entwicklungsstufen während der Pubertät.

Testikel (Hoden) ist ein männliches inneres Geschlechtsorgan, in dem u. a. das männliche Geschlechtshormon Testosteron produziert wird.

Thyroxin iodhaltiges Schilddrüsenhormon, nicht so wirksam wie Triiodthyronin. Entwicklungsregulierung bei embryonaler Körperentwicklung.

Triiodthyronin iodhaltiges und wirksamstes Schilddrüsenhormon. Wachstumsregulierung bei embryonaler Körperentwicklung.

Tryptophan Aromatische, unpolare Aminosäure und Ausgangsstoff bei der Biosynthese von Serotonin.

Tyrosin Aromatische, polare Aminosäure und Ausgangssubstanz der Synthese von Schilddrüsenhormonen, Katecholaminen sowie Melanin.

Zellproliferation (Proliferation) schnelle Vermehrung von Zellen, dabei übersteigt die Anzahl der neugebildeten Zelle, die Anzahl der Abgestorbenen Zellen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Mittweida, 25.08.2014